

**Heterologe Expression des humanen  $\beta_2$ -adrenergen  
Rezeptors in *Semliki Forest Virus*-Expressionssystem**

**Dissertation**

zur Erlangen des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Darui Huo

aus Nanjing, China

Frankfurt am Main, 2005

D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Erster Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Michel

---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	vii
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren</b>	1
<b>1.2 Die adrenergen Rezeptoren</b>	7
1.2.1 Der $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor	10
1.2.2 Regulation des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors	11
1.2.3. Der Gen-Polymorphismus des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors	14
<b>1.3 Heterologe Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren</b>	14
<b>1.4 Das <i>Semliki Forest</i> Virus-Expressionssystem</b>	17
<b>1.5 Ziele der Arbeit</b>	22
<b>2. Material und Methoden</b>	23
<b>2.1 Materialien</b>	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien	23
2.1.1.2 Proteaseinhibitoren	25
2.1.1.3 Detergenzien	26
2.1.1.4 Radiochemikalien	26
2.1.2 Säulenmatrizes	27
2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	27
2.1.4 Oligodesoxynukleotide	30
2.1.5 Plasmide	31
2.1.6 Proteine	31
2.1.7 Antikörper	32
2.1.8 Standards und Kits	32
2.1.9 Geräte und Material für die Rezeptorchemie	33
2.1.10 Materialien für die mikrobiologischen Arbeiten mit Bakterien	34
2.1.11 Säugerzelllinien, Nährmedien und Materialien für die Zellkultur	34
2.1.12 Geräte und sonstige Materialien	36
<b>2.2 Mikrobiologische Techniken</b>	38
2.2.1 Kultivierung und Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	38
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	38
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden</b>	39
2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	39

2.3.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	39
2.3.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.3.2 Phenolextraktion und Ethanolfällung	39
2.3.3 Restriktion und Ligation von DNA	40
2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.3.5 Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide	41
2.3.6 <i>Northern Blot</i> Analyse der RNA	41
<b>2.4 Proteinchemische Methoden</b>	42
2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.4.2 Färbung von SDS-PA-Gelen	43
2.4.2.1 <i>Coomassie</i> -Färbung	43
2.4.2.2 Silber-Färbung	43
2.4.3 <i>Western Blot</i> Analyse	44
2.4.4 Benzonase <sup>TM</sup> -Behandlung	45
2.4.5 Enzymatische Deglykosylierung	45
<b>2.5 Säulenchromatografische Methoden</b>	45
2.5.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie	45
2.5.2 Gelfiltrations-Chromatographie	46
<b>2.6 Radioligandenbindungstest</b>	47
2.6.1 PEI/Filtrationstest zur Messung des membrangebundenen $\beta_2$ adrenergen Rezeptors	47
2.6.2 Gelfiltrationstest zur Messung des solubilisierten $\beta_2$ adrenergen Rezeptors	47
2.6.3 Ligandenbindungstest zur Bestimmung der maximal bindungsfähigen Rezeptorpopulation an Zellen	48
<b>2.7 Zellkulturmethoden</b>	48
2.7.1 Anlegen und Passagieren von Kulturen adhärenter Zellen	48
2.7.2 Anlegen und Passagieren von Suspensionskulturen in Spinnerflaschen	49
2.7.3 Viabilitätstest mit Trypanblau	49
<b>2.8 Proteinproduktion mit dem <i>Semliki Forest Virus</i></b>	50
2.8.1 <i>In vitro</i> Transkription	50
2.8.2 Transfektion der Säugerzellen mittels Elektroporation	50
2.8.3 Ernte und Aktivierung der rekombinanten Viren	51
2.8.4 Infektion und Ernten der Zellen	51

2.8.5 Bestimmung des Virustiters	52
2.8.6 Zellaufschluss und Membranpräparation	52
2.8.6.1 Zellaufschluss mit Glasperlen	52
2.8.6.2 Zellaufschluss mit der Parr-Bombe	53
2.8.6.3 Zellaufschluss mit der <i>French Press</i>	53
2.8.7 Solubilisierung des $\beta_2$ adrenergen Rezeptors aus Säugerzellen Membranen	53
2.8.8 Messung der cAMP-Akkumulation in Säugerzellen	54
<b>3. Ergebnisse</b>	55
<b>3.1 Konstruktion der Expressionsvektoren</b>	55
<b>3.2 <i>in vitro</i> Transkription</b>	59
<b>3.3 Produktion des humanen <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors mit dem <i>Semliki Forest</i> Virus- Expressionssystem</b>	61
<b>3.4 Optimierung der heterologen Produktion des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors in Säugerzellen</b>	63
3.4.1. Optimierung der <i>in vitro</i> Transkription	63
3.4.2 Optimierung der Virusproduktion mit Hilfe der Elektroporation	65
3.4.3 Einfluss N- und C-terminaler Fusionen auf die Produktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen	69
3.4.4 Einfluss der Infektionsmultiplizität auf die Expressionsrate des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors	70
3.4.5 Zeitlicher Verlauf der Rezeptorproduktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in verschiedenen Zelllinien	72
3.4.6 Einfluss der Zugabe von Liganden ins Medium auf die Rezeptorproduktion	74
3.4.7 Effekt der extrazellulären $K^+$ -Konzentration auf die rekombinante Proteinproduktion	76
3.4.8 Einfluss der Infektionsmedien auf die Rezeptorproduktion	77
3.4.9 Einfluss von DMSO und Inhibition der Proteinkinase C auf die Rezeptorproduktion in BHK-21-Zellen	78
<b>3.5 Charakterisierung des heterolog produzierten <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors</b>	80
3.5.1 Lokalisation des rekombinanten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen	80
3.5.2 Glykosylierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen	82
3.5.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante	83
3.5.4 Kopplung des rekombinanten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors an endogene G-	85

Proteine in Säugerzellen	
<b>3.6 Produktion des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors in Suspensionskultur</b>	86
<b>3.7 Aufbruch von SFV-infizierten BHK-Zellen und Membranpräparation</b>	88
<b>3.8 Solubilisierung des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors aus Membranen von BHK-21-Zellen</b>	89
<b>3.9 Reinigung des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors</b>	90
3.9.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) mittels „HiLoad“-Chromatographie-System	90
3.9.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) mittels „ÄKTA“-Chromatographie-System	93
<b>4. Diskussion</b>	95
<b>4.1 Produktion von rekombinanten <i>Semliki Forest</i> Virus-Partikeln</b>	95
<b>4.2 Produktion des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors in Säugerzellen</b>	96
4.2.1 Rezeptorproduktion in adhärenter Zellkultur	96
4.2.2 Rezeptorproduktion in Suspensionskultur	100
4.3 Charakterisierung des produzierten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen	101
4.4 Membranpräparation und Solubilisierung	104
<b>4.5 Reinigung des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors</b>	105
<b>4.6 Ausblick</b>	106
<b>5. Literatur</b>	107
<b>Anhang</b>	

# Heterologe Expression des humanen $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in *Semliki Forest Virus*-Expressionssystem

## Zusammenfassung

Der humane  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor besitzt sieben Transmembrandomänen und gehört zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Der Rezeptor ist an der Zelloberfläche lokalisiert und kann nach Bindung extrazellulärer Signalstoffe intrazelluläre Antworten auslösen. Als physiologische Liganden des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors dienen hauptsächlich die Katecholamine wie Noradrenalin. Nach der Bindung des Liganden kann der Rezeptor an ein stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ) koppeln und durch Aktivierung der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Konzentration regulieren.

Aufgrund der großen pharmakologischen Bedeutung von GPCRs ist es wichtig, die dreidimensionale Struktur dieser Rezeptoren aufzuklären. Da die GPCRs im nativen Gewebe nur in geringen Mengen vorkommen, müssen sie heterolog überproduziert und zur Strukturaufklärung gereinigt werden. In dieser Arbeit wurde das *Semliki Forest Virus* (SFV)-Expressionssystem zur Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors etabliert und optimiert.

Die Optimierung des SFV-Expressionssystems erfolgte zunächst bei der Produktion von rekombinanten Viren. Die *in vitro* Transkriptionsreaktion wurde zur Verbesserung der RNA-Ausbeute untersucht. Anschließend wurde eine optimale Bedingung für die Elektroporation gefunden. Dabei konnte ein Virustiter von  $7,5 \times 10^8$  infektiöse Partikel pro ml erreicht werden.

Zur Produktion des Rezeptors in Säugerzellen wurden sieben rekombinante Viren hergestellt. Verschiedene N- und C-terminale Fusionen wurden im Hinblick auf einen möglichen Einfluss auf die Rezeptorproduktion untersucht. Für das Gen des Kapsid-Proteins (CAP) des *Semliki-Forest*-Virusgenoms konnte eine deutliche Steigerung der Rezeptorproduktion gefunden werden. Auch die *Kozak*-Sequenz und das Hämagglutinin (HA)-Signal-Peptid zeigten einen positiven Einfluss auf die Rezeptorproduktion.

Die heterologe Proteinexpression wurde in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Es zeigte sich, daß die BHK-21-Zellen für die Produktion in großen Mengen am besten geeignet sind. Die Expressionsrate des Rezeptors in BHK-21-Zellen stieg mit zunehmender Infektionsmultiplizität (MOI). Durch Zugabe von Liganden Alprenolol ins Kulturmedium konnte eine weitere signifikante Steigerung von Rezeptorproduktion erzielt werden. So konnte in adhärenenten BHK-21-Zellen 20 Stunden nach der Infektion bei einer MOI von 150 und 2  $\mu$ M Alprenolol im Medium eine Produktionsrate von 49,6 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erreicht werden. In Suspensionskultur konnte eine Produktionsrate von 36,0

pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erreicht werden. Damit konnten 0,2 mg Rezeptoren aus 1 Liter Suspensionskultur produziert werden. Die Rezeptorproduktion in Suspensionskultur könnte jedoch weiter verbessert werden.

Mit Immunogoldmarkierung konnte eine überwiegende Lokalisation des Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum festgestellt werden. Eine N-Glykosylierung des Rezeptors konnte nachgewiesen werden. Die Glykosylierung gehört zum mannosereichen Typ. Für den Rezeptor wurde eine Dissoziationskonstante von 2,7 nM für Liganden [<sup>3</sup>H]-CGP-12177 bestimmt. Durch Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde die vollständige Funktionalität des rekombinanten Rezeptors nachgewiesen.

Für die Membranpräparation wurde ein Protokoll erarbeitet, womit ca. 120 mg Membranprotein aus 1 Liter Zellkultur gewonnen werden konnten. Bei der anschließenden Solubilisierung des Rezeptors mit 1,5 % *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid bei pH 7,4 und 100 mM NaCl konnte eine Ausbeute von ca. 100% erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte nach verschiedenen Versuchen gezeigt werden, daß eine Reinigung über Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) in einem einzigen Schritt nicht möglich war.



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 4-Toluidinsalz
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	3',5'-cyclo-Aenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CHAPS	3-[N-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMC	Kritische Mizellenkonzentration
cpm	Zählereignisse pro Minute
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DM	n-Decyl-β-D-maltosid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Egel's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doc	Desoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSK	Forskolin
g	Zentrifugalbeschleunigung; $1g = 9,81 \text{ m/s}^{-2}$
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMEM	<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
h	Stunden
HEK	<i>Human Embryo Kidney</i>
H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub>	Durch eine Milli-Q-Plus-Anlage (Millipore) gereinigtes Wasser
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure)
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie
IMEM	<i>Isocove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IP3	Inositoltriphosphat
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	<i>Luria Bertani</i>
LM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
min	Minute
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

NBT	Nitroblautetrazolium, Toluidinsalz
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
Pi	Anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAsin	Ribonukleaseinhibitor
RT	Raumtemperatur
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
$\tau$	Halbwertszeit beim exponentiellen Abbau eines elektrischen Feldes
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin-Hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
UM	n-Undecyl- $\beta$ -D-maltosid
upm	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind membranständige Rezeptorproteine mit sieben Transmembrandomänen, deren Signalübertragungsmechanismus an eine Aktivierung GTP-bindender Proteine (kurz G-Proteine) gekoppelt ist. Die GPCRs können eine äußerst große Vielfalt an externen Signalen empfangen. Die Signalmoleküle umfassen Photonen, Kationen, Nukleotide, Lipide, Peptide, Proteine, Hormone, Neurotransmitter, Geruchs- und Geschmacksstoffe (Übersichtsartikel: Gudermann *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1998). Die Signaltransduktion über GPCRs ist bei vielen physiologischen und pharmakologischen Prozessen von großer Bedeutung, und Funktionsstörungen von GPCRs können zu schwerwiegenden Krankheiten führen (Übersichtsartikel: Marchese *et al.*, 1999; Gudermann *et al.*, 2000; Schöneberg *et al.*, 2002).

Mit rund 2000 beschriebenen Rezeptortypen (>1% des Genoms) gehören die GPCRs zu den größten Proteinfamilien bei Wirbeltieren (Übersichtsartikel: Bockaert & Pin, 1999). Bei der Analyse des Human-Genom-Projekts wurden 616 humane Gene gefunden, die für die GPCRs kodieren (Venter *et al.*, 2001). In der neusten Untersuchung konnten über 800 Gensequenzen für GPCRs im menschlichen Genom identifiziert werden (Takeda *et al.*, 2002; Fredriksson *et al.*, 2003).

Die GPCRs stellen bedeutende pharmakologische Zielstrukturen dar. Es wurde geschätzt, dass mindestens ein Drittel aller derzeit auf dem Markt befindlichen Arzneimittel gegen diese Rezeptoren gerichtet sind (Übersichtsartikel: Flower, 1999; Sautel & Milligan, 2000; Robas *et al.*, 2003). Medikamente für die Behandlung von durch GPCR regulierten Krankheiten stehen für ein weltweites Verkaufsvolumen in Milliardenhöhe ([www.woodmac.com/pharmresqt.htm](http://www.woodmac.com/pharmresqt.htm)). Das Potenzial von auf GPCR basierenden Medikamenten ist allerdings noch lange nicht ausgeschöpft, da bisher erst 10 % der GPCRs als pharmakologische *Targets* genutzt werden (Vassilatis *et al.*, 2003). Desweiteren gibt es bis zu 200 sogenannte *Orphan* GPCRs, deren Sequenzen im Genom identifiziert wurden, Liganden und Funktionen jedoch unbekannt sind (Übersichtsartikel: Pierce *et al.*, 2002). Durch die Bestrebungen, die entsprechenden Liganden zu finden, wurden in den letzten Jahren eine Reihe endogener Substanzen als wichtige Agonisten für *Orphan* GPCRs identifiziert, wie z.B. der Neurotransmitter Hypokretin/Orexin (Übersichtsartikel: Howard *et al.*, 2001), das Peptidhormon Ghrelin (Übersichtsartikel:

Kojima *et al.*, 2001), das Insulin-ähnliche Hormon Relaxin (Hsu *et al.*, 2002) und die sogenannten Spuramine (Übersichtsartikel: Davenport, 2003).

### **Klassifikation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren**

Die GPCRs werden aufgrund von Sequenzhomologien in sechs Klassen (A-F) eingeteilt (Kolakowski, 1994; Übersichtsartikel: Strader *et al.*, 1995; Bockaert & Pin, 1999). In höheren Organismen sind bisher nur Mitglieder der Klassen A-C gefunden worden. Die GPCRs im menschlichen Genom bilden fünf Familien: Rhodopsinfamilie, Sekretin-, metabotroper Glutamat-, Adhäsion- und *Frizzled/Taste2* Rezeptorfamilie (Fredriksson *et al.*, 2003). Die fünf Familien sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Bezeichnung	Gruppen	Mitgliederzahl
Rhodopsinfamilie	$\alpha$ : Prostanoid-Rezeptoren, Aminrezeptoren, Opsin-Rezeptoren, Melantonin-Rezeptoren, Cannabinoid-Rezeptoren, Melanokortin-Rezeptoren $\beta$ : Hypokretin-Rezeptoren, Tachykinin-Rezeptoren, Neuropeptid FF-Rezeptoren, Neuropeptid Y-Rezeptoren, Neurotensin-Rezeptoren $\gamma$ : Somatostatin-Rezeptoren, Opioid-Rezeptoren, <i>melanin-concentrating hormone</i> (MCH)-Rezeptoren, Chemokin-Rezeptoren $\delta$ : <i>meiosis activating sterol</i> (MAS)-ähnliche Rezeptoren, Purinrezeptoren, Glykoprotein-Rezeptoren, Geruchsrezeptoren	701 (460 Geruchsrezeptoren)

Sekretin-Rezeptorfamilie	Calcitonin-ähnliche Rezeptoren, <i>parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide</i> (PTH/PTHrP)-Rezeptoren, Sekretin-ähnliche Rezeptoren, Glukagon-Rezeptor, <i>gastric inhibitory polypeptide</i> (GIP)-Rezeptor, <i>vasoactive intestinal peptide</i> (VIP)-Rezeptor	15
metabotrope Glutamat-Rezeptorfamilie	metabotrope Glutamatrezeptoren, GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren, <i>taste</i> (TAS1)-Rezeptoren, Kalzium-Sensor Rezeptor	15
Adhäsion-Rezeptorfamilie	<i>barin-specific angiogenesis-inhibitory</i> (BAI)-Rezeptoren, <i>EGF LAG seven-pass G-type</i> (CELS)-Rezeptoren, Lectomedin-Rezeptoren	24
<i>Frizzled/Taste2</i> -Rezeptorfamilie	<i>Taste2</i> (TAS2)-Rezeptoren <i>Frizzled</i> (FZD)-Rezeptoren	24

Tabelle1.1: Klassifikation der menschlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (übernommen aus Fredriksson *et al.*, 2003).

Die größte Familie stellt die Rhodopsinfamilie dar, die ca. 90% aller menschlichen GPCRs umfasst. Diese Familie entspricht der Klasse A im A-F Klassifikationssystem. Aus dieser Gruppe sind das Rhodopsin und die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren die bestcharakterisierten Mitglieder. Die Rezeptoren dieser Familie besitzen ein NS $\times$ NP $\times$ Y-Motiv in der zweiten Transmembrandomäne und ein DRY-Motiv am Ende der dritten Transmembrandomäne. Das DRY-Motiv, eine Asp-Arg-Tyr Konsensussequenz hat eine strukturstabilisierende Funktion und ist vermutlich an der Signaltransduktion beteiligt. Die Bindungsstelle des Liganden liegt meistens in einer hydrophilen Tasche, die von den transmembranen Helices gebildet wird. Die Ausnahme sind Rezeptoren für große Liganden wie Glykoprotein-Hormone (LH, FSH, TSH), die ausschließlich an die N-terminale Region binden (Übersichtsartikel: Ji. *et al.*, 1998).

Die Sekretin-Rezeptorfamilie entspricht der Klasse B im A-F Klassifikationssystem. Die Rezeptoren dieser Familie binden Peptidhormone (Übersichtsartikel: Harmar, 2001). Die meisten Rezeptoren besitzen eine N-terminale Signalsequenz. Der 60-80 Aminosäuren lange N-Terminus hat mehrere hochkonservierte Cysteinreste und spielt eine wichtige Rolle bei Ligandenbindung. Fast alle Mitglieder dieser Familie regulieren den intrazellulären cAMP-Spiegel durch Kopplung an das G-Protein G<sub>s</sub>.

Die Familie der metabotropen Glutamaterezeptoren entspricht der Klasse C im A-F Klassifikationssystem. Trotz kleiner Liganden besitzen die Rezeptoren dieser Familie eine sehr große N-terminale Domäne (500-600 Aminosäuren), auf der wahrscheinlich die Ligandenbindungsstelle liegt.

Die Adhäsion-Rezeptorfamilie zeichnet sich durch ein oder mehrere Adhäsion-ähnliche Motive am N-Terminus aus, wie z.B. *EGF-like repeats*, Mucin-ähnliche Regionen und Cystein-reiche Domänen, die bei der Zelladhäsion beteiligt sind (Übersichtsartikel: Hayflick, 2000; Harmar, 2001). Der N-terminale Bereich dieser Rezeptoren hat eine variable Länge (200-2800 Aminosäuren) und besitzt mehrere Glykosylierungsstellen und Prolinreste.

Die TAS2-Rezeptoren haben einen sehr kurzen N-Terminus. Die Rezeptoren kommen in den Zellen der Zunge und des Gaumenepithels vor. Über ihre Funktion ist noch wenig bekannt, außer, dass sie Rezeptoren für Bittergeschmack sind (Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Matsunami *et al.*, 2000). Die FZD-Rezeptoren sind, durch die Bindung sekretierter Glykoproteine aus der Wnt-Familie, sowohl an der Regulation der Zelldifferenzierung, Proliferation und Morphogenese während der Embryonalentwicklung als auch an der Regelung der Zellapoptose beteiligt (Slusarski *et al.*, 1997). Die Rezeptoren besitzen extrazellulär eine Cystein-reiche Domäne, die als Bindungsstelle für Wnt-Proteine dient.

### **Struktur und Signalübertragung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren**

Im Jahr 2000 wurde die erste Kristallstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors – Rhodopsin- mit einer Auflösung von 2,8 Å erhalten (Palczewski *et al.*, 2000). Diese Strukturkenntnisse werden verwendet, um eine Vorhersage für die mögliche Struktur von GPCRs zu machen (Krebs *et al.*, 2003). Für die Rezeptoren, deren Liganden Amine oder ähnliche kleine Moleküle sind, ist das Rhodopsinmodell bei der Berechnung der Struktur besonders nützlich (Übersichtsartikel: Filipek *et al.*, 2003). Allerdings muss man die Tatsache berücksichtigen, dass Rhodopsin nur eine niedrige Sequenzhomologie zu den meisten anderen

GPCRs aufweist und wegen der Präsenz eines inversen Agonisten (11-*cis*-Retinal) die Kristallstruktur des Rhodopsins zu einem inaktiven Rezeptor gehört.

Basierend auf der Sequenzanalyse wurde für alle GPCRs eine ähnliche strukturelle Architektur vorgeschlagen (Baldwin, 1993). Die Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, sieben hydrophoben,  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen und einem C-terminalen intrazellulären Segment. Die einzelnen Transmembrandomänen werden intrazelluläre wie auch extrazelluläre durch je drei hydrophile Schleifen miteinander verbunden. Durch eine Palmitoylierung an hochkonservierten Cysteinen kann der C-Terminus in vielen GPCRs an der Membran verankert werden, so dass eine vierte intrazelluläre Schleife entsteht. Jeder der sieben Transmembranhelizes besteht aus 20-30 Aminosäuren. Im Gegensatz dazu ist die Länge der N- und C-terminalen Bereiche (7-600 Aminosäuren) und der extra- und intrazellulären Schleifen (5-230 Aminosäuren) sehr variabel.

Generell bewirkt die Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zu einer Unterbrechung der ionischen Wechselwirkung zwischen der dritten und sechsten Transmembrandomäne führt (Ballesteros *et al.*, 2001; Shapiro *et al.*, 2002). Diese Bewegung der Transmembrandomänen verursacht eine intrazelluläre Oberflächenänderung des GPCRs. Die C-Termini von Transmembranhelix 2, 3, 6 und 7 werden mehr exponiert (Übersichtsartikel: Meng & Bourne, 2001). Dadurch werden einige versteckte Aminosäureabschnitte als Bindungsstellen für heterotrimere G-Proteine zugänglich (Übersichtsartikel: Wess, 1997; Gether & Kobilka, 1998; Gershengorn & Osman, 2001). Das cytosolisch an den Rezeptor gebundene G-Protein verändert ebenfalls seine Konformation. Das im Ruhezustand an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins gebundene GDP löst sich und GTP, das in höheren Konzentrationen in der Zelle vorhanden ist, bindet an die  $\alpha$ -Untereinheit. Nach diesem GDP-GTP Austausch folgt eine Dissoziation des G-Proteins in  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ - Untereinheiten. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind in der Lage, als sekundäre Botenstoffe intrazelluläre Effektorproteine zu regulieren (Übersichtsartikel: Nurnberg *et al.*, 1995; Schwindinger W.F. & Robishaw, 2001). Durch die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit wird das GTP zu GDP und Pi (freiem Phosphat) hydrolysiert, woraufhin die  $\alpha$ -Untereinheit wieder mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zum inaktiven trimeren G-Proteinkomplex reassoziert. Damit ist der Ausgangszustand wieder hergestellt (Übersichtsartikel: Ross & Wilkie, 2000). Eine Übersicht über den G-Protein-Zyklus zeigt die Abbildung 1.1.

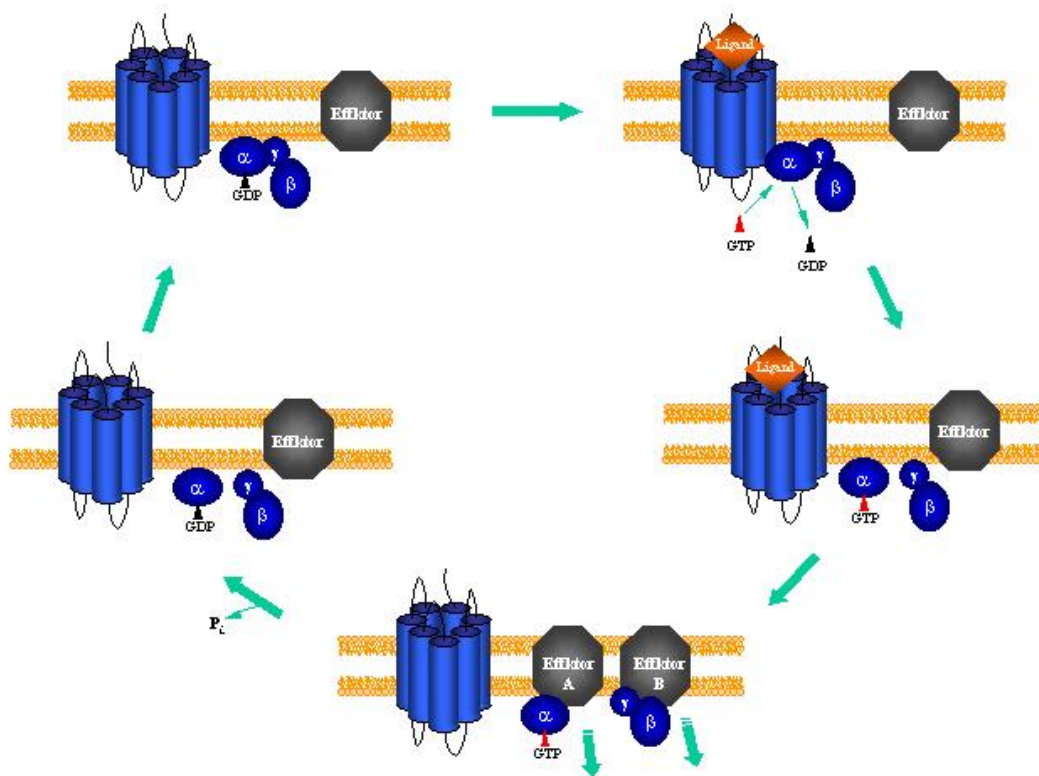


Abb.1.1: Der G-Protein-Zyklus. Im wesentlichen übernommen aus Offermanns, 2003. Weitere Erläuterungen sind im Text beschrieben.

### Organisation der Signalübertragung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Alle Zelltypen höherer Organismen besitzen eine große Vielfalt von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die mit nur einer begrenzten Anzahl von G-Proteinen interagieren. Außerdem kann ein einzelner Rezeptor mit verschiedenen G-Proteinen in Wechselwirkung treten (Laugwitz *et al.*, 1996). Neben der klassischen Signalkaskade über G-Proteine existieren noch mehrere alternative Signalwege für GPCRs. Da aber G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine exakte physiologische Antwort vermitteln können, lautet hier die Zentralfrage: Wie wird diese hohe Spezifität, Selektivität und Genauigkeit der Rezeptor/G-Protein-Interaktion ermöglicht? Nach heutiger Meinung bildet der Rezeptor mit anderen Komponenten der Signalkaskade einen funktionellen Komplex. Bisher wurden mehr als 50 Proteine identifiziert, die an Bildung solcher Komplexe beteiligt sind (Übersichtsartikel: Bockaert *et al.*, 2003). Die meisten dieser sogenannten *GPCR-associated* Proteine besitzen eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne (z.B. PDZ, SH2 und SH3, EVH) und interagieren mit dem C-Terminus des Rezeptors (Übersichtsartikel: Pierce *et al.*, 2002; Hall & Lefkowitz, 2002; Bockaert *et al.*,



2003). Durch Bildung supramolekularer Komplexe wird die Geschwindigkeit der Signaltransduktion erhöht und die Spezifität und Sensitivität der Signalverarbeitung gesichert. Die Mikrodomänen der Plasmamembran, wie z.B. Lipid Rafts und Caveolae, können auch als funktionelle Komplexe angesehen werden. Rafts und Caveolae enthalten Moleküle der Signaltransduktion (GPCRs, heterotrimere G-Proteine, Kinasen der Src-Familie, GPI-verankerte Proteine, Ras, PKC- $\alpha$ , PLC- $\gamma$ , Adenylylcyclasen) und sind an der Organisation und Kompartimentierung von Signalwegen beteiligt (Übersichtsartikel: Simons & Ikonen, 1997; Pike, 2003).

### **Dimer- und Oligomer-Bildung von GPCR**

In dem klassischen Modell der Signaltransduktion agieren G-Protein gekoppelte Rezeptoren und G-Proteine mit einer Stöchiometrie von 1:1 miteinander. In der letzten Zeit wurden jedoch immer mehr Indizien zusammengetragen, die für eine Oligomerisierung der GPCRs sprechen (Übersichtsartikel: Rios *et al.*, 2001; Bouvier, 2001; Devi, 2001). Viele Rezeptoren können Homodimere bilden, wie z.B. der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor, Bradykinin-Rezeptoren, Dopamin-Rezeptoren, Histamin-Rezeptoren, Opioid-Rezeptoren und Serotonin-Rezeptoren. Auch Heterodimerbildung zwischen Subtypen von Rezeptoren oder zwischen verschiedenen Rezeptoren einer Familie kommt vor. Die Dimerisierung ist erforderlich für den Transport mancher Rezeptoren an die Zelloberfläche, wie z.B. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, und damit essentiell für die Rezeptorfunktion (Galvez *et al.*, 2001). Am  $\kappa$ - und  $\delta$ -opioide-Rezeptor konnten Heterodimere mit neuartigen Ligandenbindungs- und funktionellen Eigenschaften gezeigt werden (Jordan & Devi, 1999). Im allgemein wurde angenommen, dass durch Dimerbildung der GPCRs die Spezifität für Agonist und Antagonist verändert und das Spektrum an intrazellulären Signalwegen erweitert wird. Welche Regionen des Rezeptors für die Dimerbildung eine Rolle spielen, bleibt noch ungeklärt. Zwei Typen von intermolekularen Wechselwirkungen konnten jedoch in Rezeptoroligomeren gezeigt werden: extrazelluläre Disulfidbrücken und Interaktionen zwischen Transmembrandomänen.

## 1.2 Die adrenergen Rezeptoren

Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor wird als Prototyp der GPCRs betrachtet und gehört zu der Gruppe der adrenergen Rezeptoren. Die Liganden dieses Rezeptortyps sind die Katecholamine. Als

Katecholamine werden die Substanzen Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin zusammengefasst. Die Katecholamine können sowohl als Neurotransmitter wie auch als Hormon agieren. Im Zentralnervensystem (ZNS) werden Katecholamine in Nervenzellgruppen des Hirnstamms und des Hypothalamus synthetisiert. Im peripheren Nervensystem ist Noradrenalin der wichtigste Neurotransmitter sympathischer Nervenzellen von Säugern und regelt die Spannung von glatten Muskelzellen in Gefäßwänden und Atemwegen (Übersichtsartikel: Nagatsu & Stjarne, 1998; Schulz *et al.*, 2004).

Die Synthese und Freisetzung von Katecholaminen wird ausgelöst durch Reize wie Angst, Schmerz, Kälte, Hitze und Stress. Im Hypothalamus und im Hirnstamm wird die Antwort darauf initiiert und durch den Neurotransmitter Acetylcholin zu einer Stimulation des Nebennierenmarks weitergegeben, wodurch die beiden Hormone Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet werden. Dabei bestehen die aus dem Nebennierenmark freigesetzten Katecholamine zu ca. 80% aus Adrenalin und zu ca. 20% aus Noradrenalin.

Adrenalin und Noradrenalin binden an G-Protein gekoppelte  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren. Aufgrund pharmakologischer Unterschiede in der Ligandenbindung und des nachgeschalteten Effektorsystems unterscheidet man zwischen  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Übersichtsartikel: Bylund *et al.*, 1994). Jede dieser 3 Hauptklassen konnte weiter in jeweils 3 Subtypen eingeteilt werden. Diese Einteilung beruht auf unterschiedlichen Sequenzen.

Die  $\alpha_1$ -Rezeptoren sind an G-Proteine der  $G_q$  Familie gekoppelt (Übersichtsartikel: Hague *et al.*, 2003). Über die Aktivierung der Phospholipase C wird Inositrtriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) gebildet.  $IP_3$  mobilisiert  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, wie z.B. dem sarkoplasmatischen Reticulum. Physiologisch führen aktivierte  $\alpha_1$ -Rezeptoren zur Vasokonstriktion arterieller Blutgefäße und damit zu einer Verstärkung des Blutflusses (Übersichtsartikel: Graham *et al.*, 1996). Die Erregung der  $\alpha_2$ -Rezeptoren führt über  $G_i$ -Protein zu Deaktivierung der Adenylatzyklase (Übersichtsartikel: MacMillan *et al.*, 1998). Dadurch sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel und damit die Aktivität der Proteinkinase A. Es kommt zur Hemmung der Lipolyse.

Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren aktivieren die Adenylatzyklase über das  $G_s$ -Protein und bewirken damit einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Übersichtsartikel: Fraser & Venter, 1990). Im Herz wird dadurch der intrazelluläre Calciumspiegel erhöht, in der glatten Muskulatur wird dagegen durch einen Netto-Ausstrom von  $Ca^{2+}$  und Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum die intrazelluläre Calciumkonzentration gesenkt. Der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor kommt überwiegend im Herz und in den Blutgefäßen vor, wo er unter

anderem für die Regulation des Blutdrucks und der Plusfrequenz mitverantwortlich ist. Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor kommt unter anderem in der Leber und den glatten Muskelzellen, der Lunge und der Gebärmutter vor, wo er für die Kontraktion bzw. die Relaxation der Muskelzellen verantwortlich ist. Der  $\beta_3$ -adrenerge Rezeptor kommt hauptsächlich im Fettgewebe vor und reguliert den Lipidstoffwechsel (Übersichtsartikel: Strosberg, 1997).

Eine Zusammenfassung über Vorkommen und Wirkung der adrenergen Rezeptoren zeigt die Tabelle 1.2.

Vorkommen	Physiologische Wirkung	Rezeptor
Herz	Herzfrequenz $\uparrow$ Überleitungsgeschwindigkeit $\uparrow$ Kontraktilität $\uparrow$	$\beta_1$
Niere	Freisetzung von Renin $\uparrow$	$\beta_1$
Glatte Muskulatur Gefäße (v.a. Arteriolen) Uterus Bronchiolen	Kontraktion Erschlaffung	$\alpha_1$ $\beta_2$
Magen-Darm-Trakt Längsmuskulatur Sphinkteren	Kontraktion Erschlaffung	$\alpha_1$ $\alpha_2, \beta_2$
Urogenital-Trakt Sphinkter <i>vesicae</i> <i>Vas deferens</i>	Kontraktion Erschlaffung	$\alpha_1$ $\beta_2$
Auge <i>M. dilatator pupillae</i>	Mydriasis	$\alpha_1$
Haut <i>M. erector pili</i>	Kontraktion	$\alpha_1$
Leber	Glykogenolyse $\uparrow$	$\beta_2$
Skelettmuskulatur	Glykogenolyse $\uparrow$ $K^+$ -Aufnahme $\uparrow$ Tremor $\uparrow$	$\beta_2$

Fettgewebe	Lipolyse ↑	$\beta_2, \beta_3$
	Lipolyse ↓	$\alpha_2$
Speicheldrüsen	$K^+$ -H <sub>2</sub> O-Sekretion ↑	$\alpha_1$
	Amylase-Sekretion ↑	$\beta_1$
Pankreas	Insulinfreisetzung ↑	$\beta_2$
	Insulinfreisetzung ↓	$\alpha_2$
Thrombozyten	Aggregation ↑	$\alpha_2$
Mastzellen	Degranulation ↑	$\alpha_2$
Medulla <i>Oblongata</i>	Barorezeptorenreflex ↑	$\alpha_2$

Tabelle 1.2: Die Lokalisation und Wirkung adrenerger Rezeptoren (aus Forth/Hentschler/Rummel, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie).

### 1.2.1 Der $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor

Der humane  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor hat 413 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 45 kDa. Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ist ein Glykoprotein. Der N-terminale Bereich ist extrazellulär lokalisiert und besitzt drei Konsensussequenzen für die N-Glykosylierung. Allerdings wirkt sich eine Deletion dieser Glykosylierungsstellen nicht auf die Ligandenbindung aus (Rands *et al.*, 1990; Strosberg & Marullo, 1992). Der C-Terminus hat mehrere Phosphorylierungsstellen, die von verschiedenen Proteinkinasen (z.B. Proteinkinase A,  $\beta$ -AR-Kinase) erkannt und phosphoryliert werden (Übersichtsartikel: Collins *et al.*, 1991b). Der Rezeptor verfügt extrazellulär über vier Cysteine, zwei konservierte und zwei nichtkonservierte. Bei diesem Rezeptor werden die Disulfidbrücken, anders als bei anderen GPCRs, zwischen je einem konservierten und einem nicht-konservierten Cystein (Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>191</sup> und Cys<sup>184</sup>-Cys<sup>190</sup>) gebildet. Beide Disulfidbrücken spielen eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung und können die Ligandenbindungstasche stabilisieren (Noda *et al.*, 1994).

Durch Mutationsanalyse konnten die wichtigen Aminosäurereste identifiziert werden, die wahrscheinlich an der Ligandenbindung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors beteiligt sind. Diese Aminosäurereste befinden sich in fast allen Transmembranhelices: Asp<sup>79</sup> in TMII; Trp<sup>109</sup>, Thr<sup>110</sup> und Asp<sup>113</sup> in TMIII; Ser<sup>165</sup> in TMIV; Ser<sup>203</sup>, Ser<sup>204</sup> und Ser<sup>207</sup> in TMV; Asn<sup>293</sup> in TMVI; Tyr<sup>308</sup> und Asn<sup>312</sup> in TMVII (Dohlman *et al.*, 1988; Mitchell *et al.*, 1989; Suryanarayana *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1996; Isogaya *et al.*, 1999; Liapakis *et al.*, 2000).

Die beide Serinreste in Transmembrandomäne V bilden Wasserstoffbrücken zu meta- und para-Hydroxygruppe des Katecholamins. Die protonierte Aminogruppe und aliphatische Hydroxygruppe des Katecholamins stehen in Wechselwirkung mit Asp<sup>113</sup> und Ser<sup>165</sup> ebenfalls über Wasserstoffbrücken (Isogaya *et al.*, 1999).

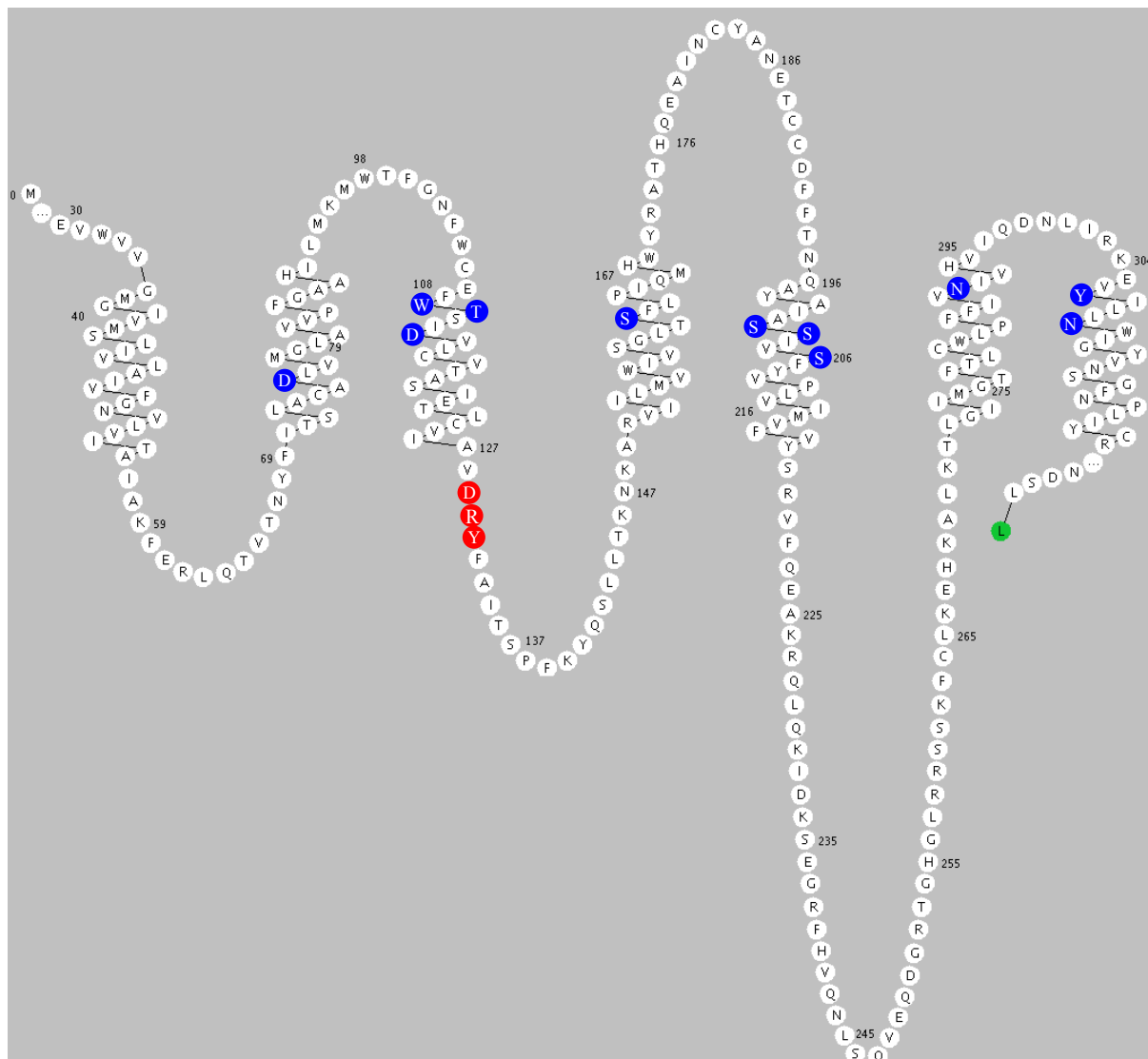


Abb.1.2: Schematische Darstellung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ([www.gpcr.org](http://www.gpcr.org)). Blau markiert sind die möglichen Aminosäurereste, die an der Ligandenbindung beteiligt sind. Das DRY-Motiv ist rot markiert.

## 1.2.2 Regulation des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

Die Signaltransduktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors unterliegt einer strengen Kontrolle. Die Regulation kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Auf transkriptioneller Ebene kann im Sinne einer *Up*- oder *Down*-Regulation die Anzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche verändert werden (Übersichtsartikel: Ferguson, 2001). In der 3'-flankierenden Region des

humanen  $\beta_2$ -AR Gens können mehrere GRE-Konsensussequenzen („*Glucocorticoid-responsive elements*“) identifiziert werden (Emorine *et al.*, 1987), welche an die Glucocorticoid-Rezeptoren binden können und dadurch die Transkription des  $\beta_2$ -AR Gens erhöhen (Mak *et al.*, 1995). Die Transkription des  $\beta_2$ -AR Gens kann auch durch Agonistbindung an den Rezeptor reguliert werden. Der aktivierte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor bewirkt eine erhöhte cAMP-Synthese über das Enzym Adenylatcyclase. Das cAMP stimuliert die Transkription durch einen Transkriptionsfaktor, der spezifisch an die CRE-Sequenzen („*cyclic AMP-responsive elements*“) in der 5'-Region des  $\beta_2$ -AR Gens bindet (Collins *et al.*, 1990; Übersichtsartikel: Collins *et al.*, 1991a).

Die Regulation der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren über Gentranskription tritt erst Stunden bis Tagen nach der Agonistenbindung auf. Eine weitere Möglichkeit der Regulation stellt die Rezeptorphosphorylierung dar, die innerhalb von Sekunden bis Minuten erfolgt. Im C-Terminus des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors findet man eine Gruppe Serin- und Threoninreste, die nach der Stimulierung des Rezeptors phosphoryliert werden (Bouvier *et al.*, 1988). Für diese Phosphorylierung spielen die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) eine wichtige Rolle. Sieben zur Familie der GRK gehörenden Proteinkinasen wurden bisher identifiziert, von denen die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorkinase,  $\beta$ ARK1 (GRK2), am besten untersucht ist. Die Interaktion der  $\beta$ ARK1 mit dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor führt zu einer allosterischen Aktivierung, worauf sie in der Lage ist, den Rezeptor zu phosphorylieren (Chen *et al.*, 1993). Durch die GRK-abhängige Phosphorylierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors und die dadurch verstärkte Bindung zu  $\beta$ -Arrestin werden, (wodurch eine weitere Aktivierung von G-Proteinmolekülen gehemmt wird) neben der Abkopplung des Rezeptors von G-Proteinen, Endozytose, Internalisierung oder Sequestration des Rezeptors eingeleitet (Laporte *et al.*, 2000; Übersichtsartikel: Lefkowitz, 1988; Ferguson, 2001). Die internalisierten Rezeptoren werden dann entweder in Lysosomen degradiert oder aber nach ihrer Dephosphorylierung zurück an die Zelloberfläche transportiert, wo sie erneut Liganden binden können und auch wieder aktivierbar sind (Abb.1.3).

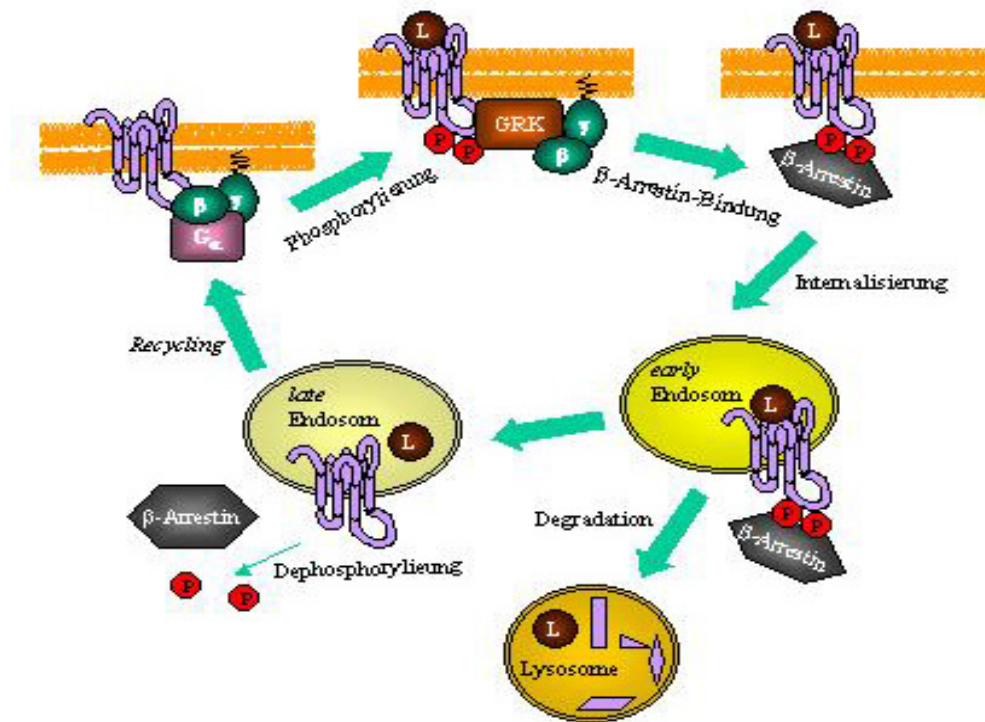


Abb.1.3: Regulation des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors durch GRK. Im wesentlichen übernommen aus Pierce *et al.*, 2002. Weitere Erläuterungen sind im Text beschrieben. L: Ligand; P: Phosphat.

Unabhängig von der  $\beta$ ARK1 kann der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor durch das cAMP-abhängige Enzym Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden (Hausdorff *et al.*, 1989; Übersichtsartikel: Collins, 1993). Dadurch werden nicht nur aktivierte Rezeptoren phosphoryliert, sondern ebenfalls Rezeptoren, die kein Signalmolekül gebunden haben. Durch die Regulation über PKA und PKC wird die Aktivität unterschiedlicher GPCRs einer Zelle reguliert, die ähnliche Signaltransduktionswege benutzen, aber durch unterschiedliche Liganden aktiviert werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung über PKA die Kopplung von  $\beta_2$ -AR an  $G_s$ -Protein zu  $G_i$ -Protein umschaltet (Zamah *et al.*, 2002).

Bei dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor wurde eine Palmitoylierung an Cys<sup>341</sup> nachgewiesen (O'Dowd *et al.*, 1989). Die Palmitoylierung wurde durch eine Agonist-Stimulation reguliert und ist relevant für die G-Protein-Kopplung (Mouillac *et al.*, 1992; Moffett *et al.*, 1993). Die zwei Serin-Reste, die sich in der Nähe der Palmitoylierungsstelle des  $\beta_2$ AR befinden, dienen als potentielle Phosphorylierungsstellen der PKA. Bei Palmitoylierung des Rezeptors sind sie vermutlich durch sterische Hinderung für die PKA nicht mehr zugänglich (Moffett *et al.*, 1996). Es wurde postuliert, dass die Palmitoylierung und die Phosphorylierung über GRK und

cAMP-abhängige Proteinkinase die Signaltransduktion des  $\beta_2$ ARs in einem koordinierten Mechanismus reguliert (Moffett *et al.*, 2001).

### 1.2.3. Der Gen-Polymorphismus des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

Das menschliche Gen für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor liegt auf Chromosom 5q31-33 (Sheppard *et al.*, 1983). Es ist sehr variabel und liegt bei der Bevölkerung in individuell unterschiedlichen Genvarianten vor. Dieses Phänomen wird als Genpolymorphismus bezeichnet. Für das  $\beta_2$ -AR Gen wurden 19 Polymorphismen identifiziert (Übersichtsartikel: Leineweber & Brodde, 2004). Die polymorphen Rezeptoren können veränderte Eigenschaften zeigen, wie z.B. in Ligandenbindung, G-Protein Kopplung, Regulation und Expression. Dies führt dazu, dass bestimmte Haplotypen dieses Gens für viele Medikamente bei der Behandlung von Asthma, Bluthochdruck, Herzkrankheit oder Fettleibigkeit unterschiedlich sensitiv sind. Es gibt mindestens 3 pharmakogenetisch wichtige Varianten für das  $\beta_2$ -AR Gen (Übersichtsartikel: Liggett, 2000). Der Aminosäurerest an Position 16 hat entscheidender Einfluss auf eine Asthmabehandlung mit Albuterol. Eine genetische Variation auf der Position 27 steht offenbar mit Fettleibigkeit in Verbindung und der Aminosäurerest an Position 164 beeinflusst die Behandlung bei kongestiver Herzinsuffizienz.

## 1.3 Heterologe Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die meisten GPCRs kommen in ihrem nativen Gewebe nur in geringen Mengen vor. Außerdem existieren verschiedene Subtypen des Rezeptors nebeneinander. Eine Reinigung größerer Mengen reiner GPCRs aus diesen Geweben ist dann fast unmöglich. Zur Gewinnung größerer Mengen des gewünschten Rezeptors bleibt oft nur die Möglichkeit der heterologen Expression. Für die rekombinante Produktion von GPCRs stehen eine Vielzahl von Expressionssystemen zur Verfügung (Übersichtsartikel: Tate & Grisshammer, 1995; Tate 2001). Die biotechnologischen Produktionsmethoden basieren hauptsächlich auf dem Einsatz von Bakterien, Hefen, Insektenzellen und Säugetierzellen. Für die Produktion von GPCRs ist die Auswahl eines Expressionssystems von vielen Faktoren abhängig, wie z.B. Verwendungszweck, Ausbeute, posttranslationale Modifikationen, Zeit und Kosten. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über die Charakteristika verschiedener Expressionssysteme.



Die Biosynthese von Membranproteinen wie GPCRs ist ein ausgesprochen komplexer Prozess. Dabei spielt nicht nur Transkription und die Translation, sondern auch die Faltung, Membraninsertion und Prozessierung eine entscheidende Rolle. Oft ist ein Zusammenwirken vieler Komponenten erforderlich. Für die korrekte Faltung von Membranproteinen sind oft molekulare Chaperone beteiligt (Übersichtsartikel: Hartl *et al.*, 1994). Die meisten eukaryotischen Membranproteine sind posttranslational glykosyliert, was für die Funktionalität und intrazelluläre Translokation des Proteins essentiell sein kann. Auch andere posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung und die Palmitoylierung, sind für die Funktion von Membranproteinen erforderlich (Ponimaskin *et al.*, 2001; Übersichtsartikel: Resch, 1999). Die heterologe Produktion von GPCRs kann daher nur in Systemen erfolgen, die über eine entsprechende Ausstattung für translationale Modifikationen verfügen.

Die bakteriellen Expressionssysteme werden am häufigsten verwendet, da sie kostengünstig sind und der Zeitaufwand im Vergleich zu anderen Systemen gering ist (Übersichtsartikel: Grisshammer & Tate, 1995). Auch die Anzucht von Bakterienkulturen in Fermentern ist unproblematisch. Zudem ist die Ausbeute an rekombinanten Protein in vielen Fällen sehr hoch. Hier stehen eine Vielzahl von Expressionsvektoren und Bakterienstämmen zu Verfügung. Allerdings haben bakterielle Expressionssysteme den Nachteil, dass die rekombinanten eukaryontischen Membranproteine oft nicht richtig gefaltet sind und möglicherweise unlösliche Einschlusskörper (*inclusion bodies*) bilden. Die Entwicklung von Rückfaltungsverfahren für GPCRs steht erst am Anfang und die Ausbeute an nativem Rezeptor nach der Rückfaltung ist oft sehr niedrig (Kiefer *et al.*, 1999). Daher scheint dieses System für die Produktion von GPCRs ungeeignet zu sein.

Als niedere eukaryontische Organismen besitzen Hefen mehrere vorteilhafte Eigenschaften für die heterologe Produktion von GPCRs. Die Kultivierung von Hefen ist einfach und kostengünstig. Die Produktion großer Mengen an Biomasse ist im allgemeinen kein Problem, da sich Hefen meist sehr gut im Fermenter anziehen lassen. Als Eukaryot ist die Hefe auch in der Lage, posttranslationale Modifikationen durchzuführen, wie z.B. Glykosylierung, Bildung von Disulfidbrücken, proteolytische Prozessierung und Faltung. In den letzten Jahren wurden neben *Saccharomyces cerevisiae* weitere Hefe-Expressionssysteme entwickelt. Vor allem gewinnt die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* immer mehr an Bedeutung. In unserer Arbeitsgruppe wurden verschiedene GPCRs wie der 5HT<sub>5A</sub> Rezeptor aus Maus (Weiß *et al.*, 1995), der humane  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor (Weiß *et al.*, 1998; Reinhart, 2000) und der humane ET(B) Endothelin Rezeptor (Schiller *et al.*, 2000) in *Pichia pastoris* erfolgreich produziert.

Eigenschaft	Bakterien	Hefe und Pilze	Insektenzellen	Säugerzellen
Zellwachstum	Schnell	mittel-schnell	Langsam	langsam
Kultivierung in Schüttelkultur/Bioreaktor	ja/ja	ja/ja	ja/ja	nein/ja
Minimalmedien	Möglich	möglich	nicht möglich	Nicht möglich
Kosten für Medien	Niedrig	niedrig	Hoch	Hoch
Expressionsniveau	Hoch	niedrig-hoch	Niedrig – hoch	niedrig – mittel
Proteinfaltung	normalerweise <i>in vitro</i> Refolding	in der Regel richtige Faltung	Richtige Faltung	richtige Faltung
N-Glykosylierung	nein	ja, Mannose	ja, aber keine Sialinsäure	ja, komplex
O-Glykosylierung	nein	Ja	Ja	Ja
Phosphorylierung, Acetylierung, Acylierung	nein	Nein	Ja	Ja
<b>Tabelle 1.3 Eigenschaften verschiedener Expressionssysteme (Minning 1999).</b>				

Das Insektenzellexpressionssystem kombiniert die Vorteile der Hefesysteme und Säugerzellsysteme. Im Vergleich zu Säugerzellen wachsen Insektenzellen schneller und sind einfacher zu kultivieren. Sie lassen sich problemlos im Fermenter anziehen. Als höhere eukaryontische Zellen sind sie in der Lage, rekombinante Proteine zu falten und posttranslational zu modifizieren. Die Expression in Insektenzellen erfolgt entweder in stabilen Zelllinien oder transient durch Infektion mit rekombinanten Viren. Für die Herstellung einer stabilen Zelllinie wird in den meisten Fällen die *Drosophila* Schneider-2 (S2)-Zelllinie oder die *Spodoptera frugiperda*-Zelllinie (Sf9) eingesetzt. Die Ausbeuten sind oft sehr gering. Mit dem Baculovirus-Expressionssystem können hingegen hohe Expressionsraten erreicht werden. Mit diesem System konnten GPCRs wie der Dopamin D<sub>2</sub> Rezeptor mit 13-20 pmol/mg Membranprotein und der 5HT<sub>5A</sub> Rezeptor mit 68 pmol/mg

Membranprotein in SF9-Zellen produziert werden (Massotte, 2003). Ferner ermöglicht eine Koexpression verschiedener G-Proteine zusammen mit dem entsprechenden Rezeptor in Insektenzellen die Untersuchung der Kopplung von Rezeptoren und G-Proteinen (Grünwald, 1997; Lachance *et al.*, 1999).

Die Säugerzellen verfügen über die entsprechende Ausstattung für die Expression von GPCRs, die für die korrekte Faltung, Membraninsertion, posttranslationale Modifikation und intrazelluläre Transport nötig ist (Ramirez *et al.*, 1999). Der große Nachteil liegt darin, dass die Säugerzellen langsam auf sehr teuren Medien wachsen, schwierig zu handhaben, und oft nur adhärent kultivierbar sind. Zur Produktion von GPCRs können zum einen stabile Zelllinien hergestellt werden, was allerdings sehr zeitaufwendig ist (bis zu mehreren Monaten), und zum anderen können virale Systeme wie das Vaccinia Virus System verwendet werden (Übersichtsartikel: Karschin, 1993). Vielversprechend sind die Alphaviren, neu etablierten Semliki Forest Virus- oder Sindbis Virus Expressionssysteme (Übersichtsartikel: Herweijer & Wolff, 1997). Da diese beiden Viren auch humanpathogen sind, durften sie bis vor einigen Jahren nur unter S2-Laborbedingungen verwendet werden. Erst durch die Einführung des pSFV-Helper2 Plasmids im Semliki Forest-Expressionssystem ist dessen Gebrauch im S1 Labor gestattet (Berglund *et al.*, 1993). Im folgenden Kapitel wird dieses System ausführlicher beschrieben.

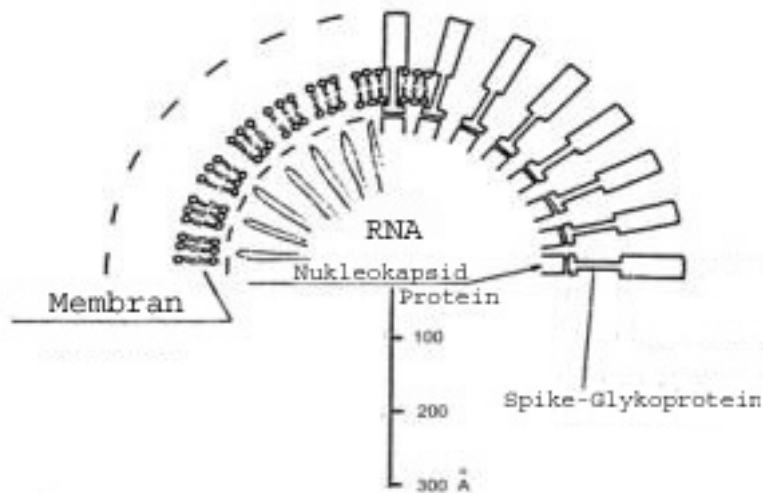
## 1.4 Das Semliki Forest Virus-Expressionssystem

Das Semliki Forest Virus (SFV) sowie das Sindbis Virus sind beide Alphaviren und gehören zur Familie der Togaviridae. 1944 wurde das SFV zum ersten Mal aus Moskitos des ugandischen Semliki Regenwaldes isoliert (Smithburn & Haddow, 1944). Das Virus hat ein sehr breites Wirtsspektrum und kann Säuger, Vögel, Reptilien sowie Insekten infizieren. Die Übertragung erfolgt in der Regel über Mücken. Menschen können auch gelegentlich infiziert werden und zeigen Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Enzephalitis, Myalgia und Arthralgia (Willems *et al.*, 1979; Mathiot *et al.*, 1990). Das Krankheitsbild kann bis zu zwei Woche andauern.

Das SFV ist ein RNA-Virus und trägt als Genom eine Einzelstrang RNA positiver Polarität (11,5 kb). Das Virusgenom ist in 240 Kapsidproteinmolekülen verpackt, die wiederum von einer Membran umhüllt sind. Die viralen „Spike“-Proteine E1 bis E3 durchspannen die Membran. Diese Glykoproteine ermöglichen den Eintritt in die Wirtszelle durch das Anheften

an zelluläre Rezeptoren. Durch Endozytose gelangt der Viruspartikel in die Wirtszelle und wird zu den Lysosomen transportiert. Das saure Milieu dort führt zu einer Konformations-

A



B

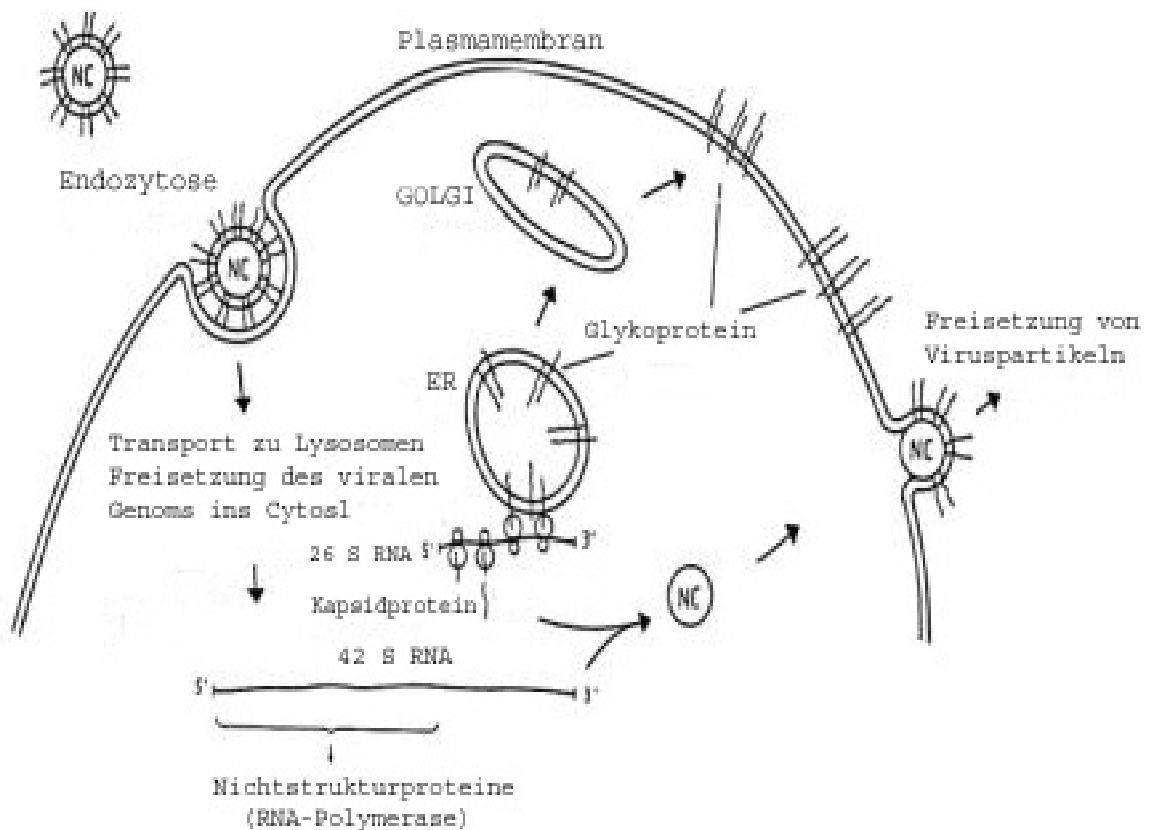


Abb.1.4.: *Semliki Forest Virus*. A. Struktur und Aufbau (Simons *et al.*, 1977). B. Lebenszyklus (Garoff *et al.*, 1982). Weitere Erläuterungen sind im Text beschrieben.

änderung der Spike-Glykoproteine, wonach eine Fusion der viralen Membran mit der lysosomalen Membran der Wirtszelle stattfindet. Anschließend wird das virale Genom in das

Cytosol freigesetzt (Helenius *et al.*, 1980). Die genomische 42 S RNA dient direkt als mRNA, von der das virale nichtstrukturelle Polyprotein translatiert wird. Das Polyprotein wird anschließend autokatalytisch in vier Nichtstrukturproteine prozessiert, die zusammen den Replikase-Komplex bilden. Diese RNA-Polymerase schreibt das (+)-Strang Genom in (-)-Strang RNA um, welche wiederum als Vorlage für die Synthese neuer (+)-Stränge dient. Außerdem wird vom (-)-Strang subgenomische 26 S RNA gebildet, die für die viralen Strukturproteine kodiert. Zu den strukturellen Proteinen des Virus gehört das Capsid-Protein und die Membranproteine E1, E2 und E3. Nach der Translation bindet das Capsid-Protein die virale genomische RNA und bildet ein Nukleokapsid. Die Membranproteine E2 und E3 werden als einen Polyproteinvorläufer p62 translatiert. p62 und E1 bilden einen Dimer in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Im Golgi-Komplex wird das p62 Protein in E2 und E3 gespalten und zur Plasmamembran transportiert, wo sie mit E1 zu einem Spike-Glykoprotein-Komplex prozessiert werden. Die Freisetzung der Viruspartikel erfolgt durch eine Art Knospung (*engl: budding*). Dabei wird das Nucleokapsid von der Zellmembran umhüllt, die die Spikeproteine enthält und nach außen abgeschnürt (Garoff *et al.*, 1982; Übersichtsartikel: Strauss & Strauss, 1994).

Für die Verwendung als Expressionssystem wurde das *Semliki Forest* Virusgenom auf zwei Vektoren, Expressionsvektor und Helfer-Vektor, verteilt (Liljestrom & Garoff, 1991). Der Expressionsvektor enthält die Gene für die Nichtstrukturproteine, den starken subgenomischen 26S-Promotor und die multiple Klonierungsstelle (MCS). Die komplette Region, welche für die Strukturproteine kodiert, ist im Expressionsvektor nicht vorhanden. Das Helferplasmid kodiert dagegen nur für die strukturellen Proteine (Capsid-Protein und die Membranproteine) des Virus, nicht jedoch für die Nichtstrukturproteine. Das Verpackungssignal befindet sich im Expressionsvektor, fehlt aber dem Helfer-Vektor. Der SP6-RNA-Polymerase Promotor in den beiden Vektoren ermöglicht eine *in vitro* Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase. Zur Produktion der Viruspartikel wird die RNA über Elektroporation in die Zellen ko-transferiert. Die von der rekombinanten RNA kodierten Nichtstrukturproteine bilden zusammen den Replikase-Komplex und ermöglichen die Replikation von rekombinanter und von Helfer-Virus RNA. Die von der Helfer-RNA kodierten Strukturproteine initiieren die Verpackung der neu gebildeten Viruspartikel. Dass dem Helferplasmid das Verpackungssignal fehlt, hat zur Folge, dass die Verpackung der Helfer-RNA in das Viruscapsid verhindert wird. Die entstandenen rekombinanten Viruspartikel enthalten lediglich die rekombinante RNA, nicht jedoch die Helfer-RNA. Diese Viruspartikel können zwar neue Zellen infizieren, jedoch keine weiteren Viruspartikel mehr

bilden. Das Prinzip des Semliki Forest Virus-Expressionssystems ist zur Verdeutlichung in Abb.1.5 dargestellt.

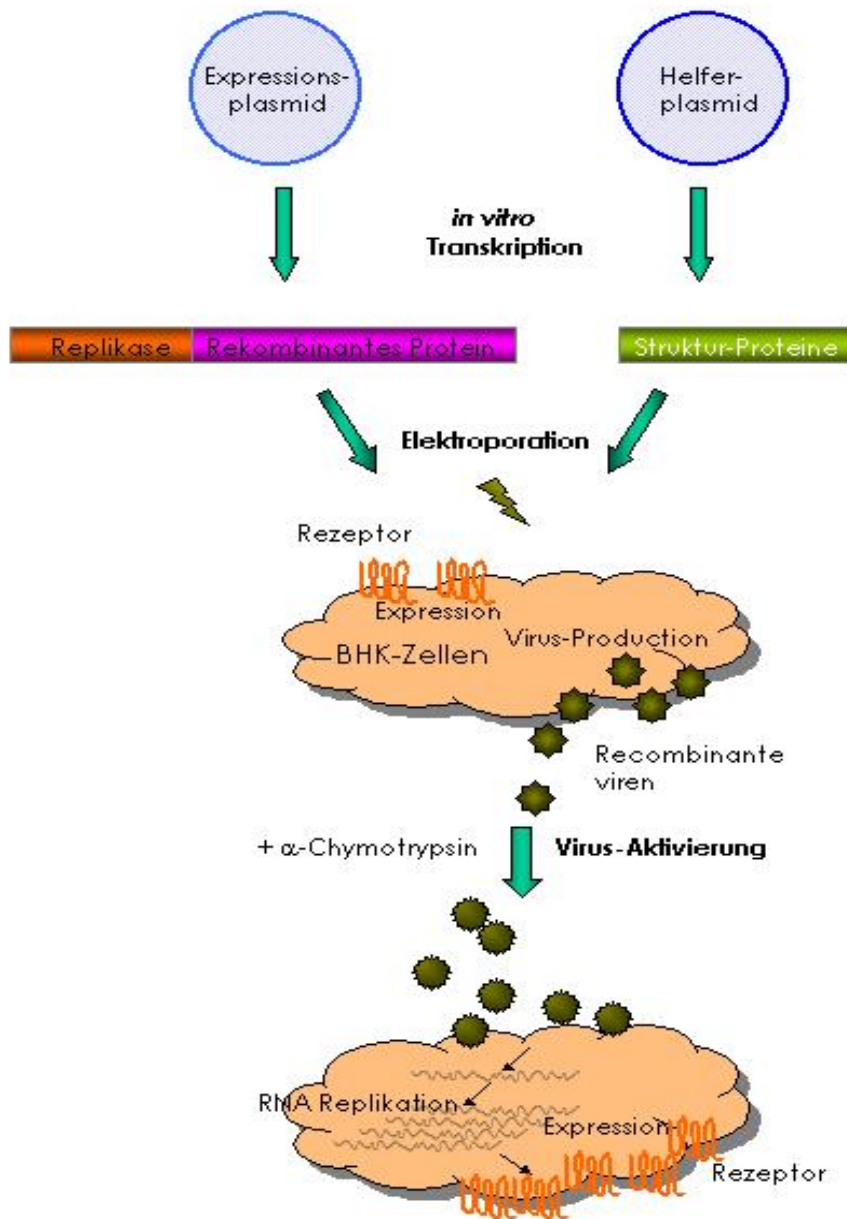


Abb.1.5: Schema des SFV-Expressionssystems.

Die vom SFV abgeleiteten Helferplasmide werden als pSFVHelper1 und pSFV-Helper2 bezeichnet. Während im Fall der Plasmide pSFVHelper1 Wildtyp-Strukturgene vorliegen, trägt das Plasmid pSFVHelper2 drei Punktmutationen im Gen für das p62-Strukturprotein. (Abb.1.6). Drei Arginin-Reste in der E2-E3-Schnittstelle wurden gegen die Aminosäuren Ser,

Gln und Leu ausgetauscht (Berglund *et al.*, 1993). Diese Mutationen verhindern die natürliche intrazelluläre Spaltung des p62-Strukturproteins in E2 und E3, welche die Aufnahme von SFV-Partikeln in die Zelle vermittelt. Viruspartikel, die dieses p62-Strukturprotein tragen, können eukaryontische Zellen daher nicht infizieren. Sie können jedoch durch Behandlung mit Chymotrypsin aktiviert werden. Die mit Chymotrypsin behandelten Viren verhalten sich bei der Infektion schließlich wie Wildtyp-Viruspartikel. Der spaltungsdefiziente Helfer2-Vektor wurde konstruiert, da mit Helfer1-Vektor die Bildung replikationsfähiger Viren nicht vollständig verhindert wird (Weiss & Schlesinger, 1991). Bei Verwendung des Helfer2-Vektors wurde die Freisetzung replikationsfähiger, infektiöser Viruspartikel nicht beobachtet. Durch Einführung des Helfer2-Vektors dürfen die Arbeiten mit diesem Expressionssystem im Labor der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt werden. (s. Zentrale Kommission für die biologische Sicherheit, ZKBS)

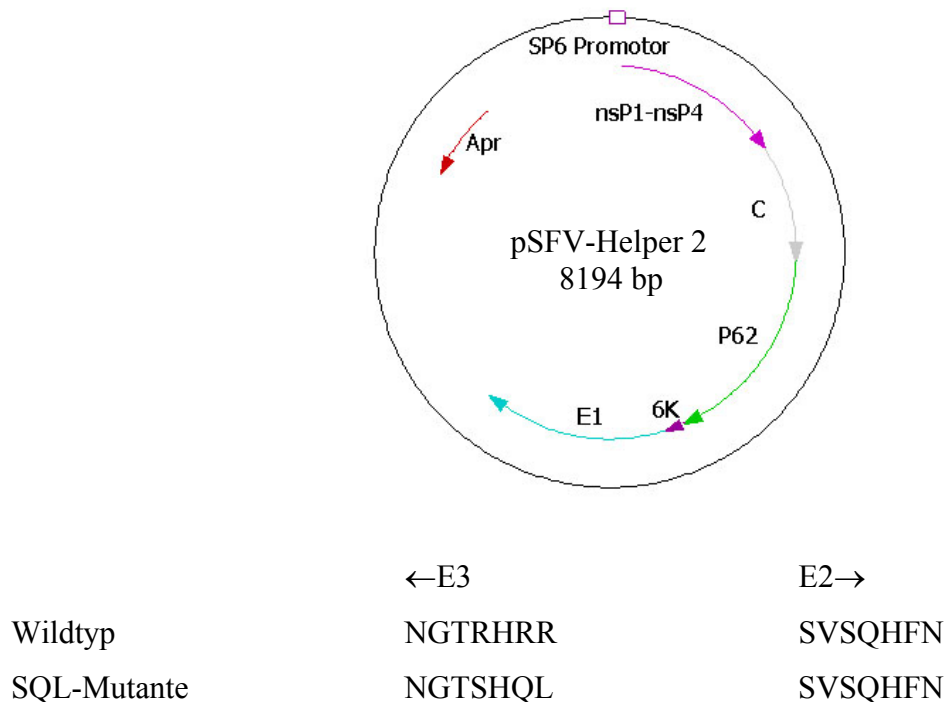


Abb.1.6: pSFV-Helfer2 DNA.: Aminosäuresequenzen des Wildtyps und der SQL-Mutante im Bereich der Endoproteasespaltstelle des p62-Spike-Proteins. (nach Berglund *et al.*, 1993)

Das Semliki Forest Expressionssystem hat sich in den letzten Jahren für die Produktion von GPCRs und Ionenkanälen etabliert (Übersichtsartikel: Lundstrom *et al.*, 1999, 2001; Lundstrom 2000, 2003). So konnten GPCRs wie z.B der humane NK1-Rezeptor, der humane Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor, und der 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor der Maus mit Hilfe des Semliki Forest Systems erfolgreich produziert werden. Dabei konnte eine Produktionsrate von bis zu 200

pmol/mg Membranprotein erreicht werden. Außerdem konnte die Produktion des 5HT<sub>3</sub>-Rezeptors in Suspensionskulturen mit BHK-21 Zellen im großen Volumenmaßstab erfolgreich durchgeführt werden (Blasey *et al.*, 2000).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor heterolog im Semliki Forest Expressionssystem zu produzieren, zu solubilisieren und anschließend zu reinigen. Zunächst sollte dieses System im Labor etabliert und optimiert werden. Es sollte evaluiert werden, ob sich das Semliki Forest System für die heterologe Produktion im Hinblick auf spätere kristallografische Studien eignet. Dazu sollten die posttranslationalen Modifikationen und die Lokalisation des Rezeptors untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss verschiedener Fusionsproteine auf die Expression und Prozessierung des Rezeptors in den Säugerzellen getestet werden. Ferner sollte die funktionelle Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in verschiedenen Zelllinien verglichen werden. Der Nachweis einer funktionellen Expression in den Säugerzellen sollte einerseits mit Ligandenbindungstest, andererseits mit G-Protein-Kopplung erfolgen.

Diverse Parameter, die die Rezeptorproduktion beeinflussen können, sollten grundlegend erforscht werden. Eine Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in großem Maßstab (1-5 L Spinnerkulturen) sollte etabliert werden, um Rezeptoren im mg-Maßstab zu produzieren. Und schließlich sollte der Rezeptor aus Säugerzellmembran solubilisiert und über verschiedene chromatographische Verfahren gereinigt werden. Dazu sollten die Eigenschaften des gereinigten Rezeptors auch untersucht werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Detergenzien, Proteaseinhibitoren und Radiochemikalien sind nach der Liste der allgemeinen Chemikalien gesondert aufgeführt. Die für die Bakterien- und Zellkultur benötigten Substanzen sind in Kapitel 2.1.10 und 2.1.11 angegeben. Alle weiteren verwendeten Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, wurden mit dem Reinheitsgrad p.A. von den Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen.

##### 2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid-Fertiglösung für SDS-Gele	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis Grade	Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg
Aktivkohle Norit GSX, Prod.33204	BDH Chemicals Ltd., Poole, U.K.
Alprenolol-hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidinsalz (BCIP)	4- Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg

Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
1-Butanol	Protochem GmbH, Wesel		
Calciumchlorid	E. Merck, Darmstadt		
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg		
Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg		
Dimethylformamid (DMF)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
1,4-Dithiothreit (DTT)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg		
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München		
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Forskolin (FSK)	Biotrend Chemikalien GmbH		
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Imidazol	E. Merck, Darmstadt		
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Magermilchpulver "Alevita"	Nestlé, München		
Magnesiumchlorid	Fluka/ Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Fluka/ Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.		
Methanol	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Natriumhydroxyd (NaOH)	E. Merck, Darmstadt		
Nitroblautetrazolium, Toluidinsalz (NBT)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg		

---

Pepton	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Szintillator Rotiscint eco plus	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Tetracyclin-Hydrochlorid (Tet)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Tunicamycin	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH, Deisenhofen

### **2.1.1.2 Proteaseinhibitoren**

Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		
Bacitracin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg		
Benzamidin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg		
Chymostatin	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden		
Complete <sup>®</sup> EDTA free	Proteaseinhibitor	<i>Cocktail</i> ,	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Leupeptin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg		
Pepstatin A	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg		
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		

### 2.1.1.3 Detergenzien

3-[N-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Cholat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Desoxycholat, Natriumsalz (Doc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Digitonin, wasserlöslich	Serva GmbH & Co., Heidelberg
n-Decyl- $\beta$ -D-maltosid (DM)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (LM)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
n-Octyl- $\beta$ -D-maltosid	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
n-Undecyl- $\beta$ -D-maltosid (UM)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
N-dodecylphosphocholine, Fos12	Anatrace, Maumee, OH, USA
N-hexadecylphosphocholine, Fos16	Anatrace, Maumee, OH, USA
N-tetradecylphosphocholine, Fos14	Anatrace, Maumee, OH, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween)	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.
Triton X-100	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.

### 2.1.1.4 Radiochemikalien

[5,7- $^3\text{H}$ ]-(-)-CGP-12177	NEN <sup>TM</sup> Life Science Products, Inc. Boston, MA
[ $^3\text{H}$ ]-Dihydroalprenolol Hydrochloride	NEN <sup>TM</sup> Life Science Products, Inc. Boston, MA

### 2.1.2 Säulenmatrizes

ImmunoPure <sup>®</sup> Immobilized Monomeric Avidin Gel	Pierce/KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin
MicroSpin <sup>™</sup> S-200 HR	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mini Q PC 1.6/3	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ni-NTA	Qiagen GmbH, Hilden
Superose 6 PC 3.2/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superose 12 PC 3.2/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ultralink <sup>™</sup> Immobilized Monomeric Avidin	Pierce/KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin

### 2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Agarosegel (1%)	1g Agarose 100 ml 1 × TAE Puffer 2,5 µl EtBr (10 mg/ml in H <sub>2</sub> O)
Ampicillin-Stammlösung 1000 ×	150 mg/ml in H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert, bei -20°C lagern)
AP-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Aprotinin 5000 ×	10 mg/ml in PBS
Auftragsmix (DNS)	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 5 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Auftragspuffer 4 × (Proteingele)	0,25M Tris/HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (w/v) Glycerin 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,004% (w/v) Bromphenolblau

BCIP-Lösung	50 mg BCIP/ml DMF Lagerung bei -20°C
Benzamidin (100 ×)	100 mM in H <sub>2</sub> O
Blotpuffer ( <i>Western Blot</i> )	38 mM Glycin 10 mM Tris 20% (v/v) Methanol
Chymostatin (100 ×)	6 mg/ml in DMSO Lagerung bei -20°C für max. 1 Monat
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie Brilliantblau R-250 200 ml H <sub>2</sub> O 50 ml Essigsäure 250 ml techn. Ethanol nach Ansetzen filtrieren
Elektrophoresepuffer 10 × (für Proteingele)	500 mM Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
Entfärbelösung ( <i>Coomassie</i> )	1 l techn. Ethanol 1 l H <sub>2</sub> O 200 ml Essigsäure
Entwickler (Silberfärbung)	2,5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,04% (v/v) Formaldehyd
Fixierlösung (Silberfärbung)	30% Ethanol 10% Essigsäure
Hepes-Puffer	20 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl 12 mM MgCl <sub>2</sub> 0,02% NaN <sub>3</sub>
Konditionierlösung (Silberfärbung)	400 mM Natriumacetat, pH 6,0 0,5% (v/v) Glutardialdehyd 0,1% (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 30% (v/v) Ethanol
Leupeptin (500 ×)	0,25 mg/ml in mp H <sub>2</sub> O Lagerung bei -20°C für max. 6 Monate

Lipidmix	3% <i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid 0,6% Cholesterylhemisuccinat 1,5 % Phosphatidylcholin
NBT-Lösung	50 mg NBT/ml 70% DMF Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$
PBS-Puffer	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 13 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1,5 mM $\text{NaN}_3$ (fakultativ)
Pepstatin A (500 $\times$ )	0,35 mg/ml in Methanol Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ für max. 1 Monat
PMSF (200 $\times$ )	200 mM in Isopropanol Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ für max. 6 Monate
Ponceau S Lösung	0,2% (w/v) Ponceau S 3% (w/v) TCA
Silberlösung (Silberfärbung)	0,1% (w/v) $\text{AgNO}_3$ 0,025% (v/v) Formaldehyd
TAE-Puffer 50 $\times$	2M Tris 1M Essigsäure 50mM EDTA, Dinatriumsalz
TBE-Puffer 10 $\times$	0.9 M Tris 0,9 M Borsäure 20mM EDTA, Dinatriumsalz
TBS-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl
TBST-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
TEN-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 2mM EDTA, Dinatriumsalz

---

TE-Puffer 100 ×	1 M Tris/HCl, pH 8,0 0,1 M EDTA, Dinatriumsalz
Tetracyclin-Stammlösung	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert) Lagerung bei –20°C
TN-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl
TPCK (100 ×)	10 mM in Ethanol

#### 2.1.4 Oligodesoxynukleotide

His10<sub>for</sub>: 5'- AAT TCC ACC ATC ACC ATC ACC ATC ACC ATC ACC ATG C-3'

His10<sub>rev</sub>: 5'- GGC CGC ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG G -3'

pSFV2CAP<sub>for</sub>: 5'- GAT CGA TGG ATC CCG GGT CTC GAA TTC GC -3'

pSFV2CAP<sub>rev</sub>: 5'- GGC CGC GAA TTC GAG ACC CGG GAT CCA TC -3'

KHAFlag<sub>for</sub>: 5'- GAT CGA AAC CAT GAA GGC AAT AAT TGT ACT ACT CAT GGT  
AGT AAC ATC CAA TGC AGA CTA CAA GGA CGA TGA CGA TAA GGA TCC CCC  
GGG C -3'

KHAFlag<sub>rev</sub>: 5'- TCG AGC CCG GGG GAT CCT TAT CGT CAT CGT CCT TGT AGT  
CTG CAT TGG ATG TTA CTA CCA TGA GTA GTA CAA TTA TTG CCT TCA TGG  
TTT C -3'

pSFV2<sub>for</sub>: 5'- G CGG TCC TAG ATT GGT GC -3'

Semliki<sub>for</sub>: 5'- TGT TAT ACA CCT CTA CGG -3'

CAP<sub>for</sub>: 5'- CTG TCG GTG GTC ACC TGG -3'

CAP<sub>rev</sub>: 5'- AAC GTT TGC GTA GGG ATG -3'

CAP<sub>back</sub>: 5'- CAT GCT TGC CTA GGT TCG -3'

β<sub>2</sub>AR<sub>for</sub>: 5'- CCA GAA GAT TGA CAA ATC TG -3'

β<sub>2</sub>AR<sub>M</sub>: 5'- GGA TTG CCT TCC AGG AGC -3'

β<sub>2</sub>AR<sub>end</sub>: 5'- AAC ATT GAT TCA CAA GGG AG -3'

β<sub>2</sub>ARG<sub>α</sub> 1: 5'- GGG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG CCC AAT AGA AGC  
CAT GCG CCG -3'

β<sub>2</sub>ARG<sub>α</sub> 2: 5'- GCA GCC ATG ATG ATG ATG ATG ATG GTG ATG GTG GTG AGT  
CAT TTG TAC TAC -3'



$\beta_2$ ARG<sub>s</sub> $\alpha$  3: 5'- GTA GTA CAA ATG ACT CAC CAC CAT CAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGC TGC -3'

$\beta_2$ ARG<sub>s</sub> $\alpha$  4: 5'- AAT AAG AAA TGC GGC CGC TAA AAC TAT TCA GAG CAG CTC GTA CTG ACG AAG -3'

### 2.1.5 Plasmide

pPIC9KFlagHis $\beta_2$ ARBio von Dr. Christoph Reinhart, MPI für Biophysik, Frankfurt

pPIC9KFlagHis $\beta_2$ ARHis in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2gen von Dr. Kenneth Lundström, Fa. Hoffmann-La Roche, Basel

pSFV2 $\beta_2$ ARHis in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2His $\beta_2$ ARBio in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2KHAFlag von Dr. Christoph Reinhart, MPI für Biophysik, Frankfurt

pSFV2KHAFlag $\beta_2$ ARHis in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2KHAFlag $\beta_2$ ARHisG<sub>s</sub>L in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2CAP in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2CAPHis $\beta_2$ ARBio in dieser Arbeit hergestellt

pSFV2CAPKHAFlag $\beta_2$ ARHis in dieser Arbeit hergestellt

pSFV3CAP in dieser Arbeit hergestellt

pSFV3CAP $\beta_2$ ARHis in dieser Arbeit hergestellt

pSFV3CAP $\beta_2$ ARHisG<sub>s</sub>L in dieser Arbeit hergestellt

pSGV3 $\beta_2$ ARGFP von Dr. Christoph Reinhart, MPI für Biophysik, Frankfurt

Helper2 von Dr. Kenneth Lundström, Fa. Hoffmann-La Roche, Basel

### 2.1.6 Proteine

Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,
	Deisenhofen		
Endoglycosidase H (Endo H)	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,
	Deisenhofen		
Lysozym	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,
	Deisenhofen		

---

N-Glycopeptidase F (PNGase F)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
RNase A	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
SP6 RNA Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 2.1.7 Antikörper

Anti-Dioxygenin- Phosphatase-Konjugat	Antikörper-alkalische	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Anti-Flag M1, monoklonaler Antikörper	Sigma-Aldrich	Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-Flag M2, monoklonaler Antikörper	Sigma-Aldrich	Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-GFP	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	
Anti-His-Tag	Qiagen GmbH, Hilden	
Anti-Mouse IgG	Sigma-Aldrich	Chemie GmbH, Deisenhofen
14E8, monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor gerichtet	Dr. Agnes Szmolenszky, MPI für Biophysik, Frankfurt	
15H6, monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor gerichtet	Dr. Agnes Szmolenszky, MPI für Biophysik, Frankfurt	

### 2.1.8 Standards und Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce/KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin
Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
DNA-Längenstandard: $\lambda$ (c/ 857 SAM7)/EcoRI, HindIII	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

---

High Molecular Weight Standard Mixture	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,
	Deisenhofen		
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden		
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden		
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH, Hilden		
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden		
SeeBlue <sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe		
Taq PCR Core Kit	Qiagen GmbH, Hilden		

### **2.1.9 Geräte und Material für die Rezeptorchemie**

Filter: Glasfaser-Mikrofilter Whatman GF/C; bezogen über Adi Hassel  
Ing.-Büro für Prozeßtechnik und Instrumentelle Analytik,  
München

Säulen: Polystyrol Leersäulen für 2 ml Matrix, Pierce, Rockford, USA;  
bezogen über Gesellschaft für Laborbedarf GmbH Würzburg

Geräte: Cell Harvester Model M-30, Brandel Inc., Gaithersburg, MD,  
USA; bezogen über Adi Hassel Ing.-Büro für Prozeßtechnik  
und Instrumentelle Analytik, München

Filtertonne, Eigenbau des MPI für Biophysik, Frankfurt/M.

Ölgeschmierte Vakuumpumpe Typ GA-460H, Dürr  
GmbH&Co. KG, Luft- und Prozessor-Technik Bietigheim-  
Bissingen

Szintillationszähler TRI-CARB<sup>®</sup> 1500, Canberra-Parkard,  
Frankfurt/M.

Inkubationsröhrchen: Polystyrol-Röhrchen 75 × 12 mm, Kat.-Nr. RE03, bezogen über  
Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg

6 ml Szintillationsfläschchen aus Polyethylen, Kat.-Nr. ESGS,  
bezogen über Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg

### 2.1.10 Materialien für die mikrobiologischen Arbeiten mit Bakterien

*E. Coli* Stamm XL1-Blue: *endA1*, *hsdR17*(rk-, mk+), *supE44*, *thi-1*,  $\lambda^-$ , *recA1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta(lacZYA-argF)$  U169 [F': *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZAM15*, Tn10(*Tet<sup>r</sup>*)] (Bullock et al., 1987),  
Stratagene GmbH, Heidelberg

#### LB-Medium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (für Festmedium)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und im Autoklav sterilisieren

### 2.1.11 Säugerzelllinien, Nährmedien und Materialien für die Zellkultur

#### Säugerzelllinien:

Bezeichnung	Ursprung	Hersteller/Kat.-Nr.
BHK-21 (C 13)	Baby Hamster Kidney	ECACC 85011433
BHK-21 (C13-2P)	Baby Hamster Kidney	ECACC 84111301
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary	ECACC 85051005
COS-7	African green Monkey kidney, SV40 transformed	ECACC 87021302
HEK-293	Human Embryo Kidney	ECACC 85120602

#### Medien für die Zellkultur:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Cell Concepts GmbH, Freiburg  
(DPBS)

---

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)	Cell Concepts GmbH, Freiburg
Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMEM)	Cell Concepts GmbH, Freiburg
Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FKS)	GibcoBRL, Life Technologies, GmbH
L-Glutamin (200mM)	Cell Concepts GmbH, Freiburg
Penicillin-Streptomycin 100 × Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tryptose Phosphate Broth Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Medium für adhärente Zellen:	45% IMEM/F12 45% DMEM 10% FCS 2 mM Glutamin
Medium für Suspensionszellen:	85% GMEM 5% Tryptose Phosphate Broth 10% FCS 2 mM Glutamin

Kulturflaschen und –schalen:

Magnet-Rührflaschen Suspensionskulturen	für Spinner-System der Firma Techne Ltd, Cambridge, U.K. Cellspin Spinner-System der Firma INTEGRA Biosciences/Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald
Micro Well™ Platten Nunclon™Δ: 96- Wells	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Multischalen Nunclon™Δ: 6/24-Wells	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
Zellkulturflaschen Nunclon™Δ: 50 ml/24 cm <sup>2</sup> , 260 ml/83 cm <sup>2</sup> , 800/175 cm <sup>2</sup>	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
Zellkulturschalen Nunclon™Δ: 5 ml/ 21,5 cm <sup>2</sup> , 35 ml/145 cm <sup>2</sup>	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Sonstige Materialien:

Autoklaven:

System V-150	System GmbH, Wetztenberg
MELAG-Dampfautoklav Typ 24	Bachofer GmbH, Reutlingen
Hoch Druckdampfsterilisator	Holzner, Nussloch
DSTLV-766-1 VP-DE	
Brutschrank Heraeus BB 6060	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Brutschrank Modell QWJ 500T	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
Einmalpipetten (serologisch, steril)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Kryoröhrchen 1 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
Mikroskop Olympus IMT-2	Olympus Optical LTD., Japan
Sterilbank Typ Nunc 20229	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
Trockenschrank Heraeus Typ T 5060 E	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zählkammer, Neubauer	Gesellschaft für Laborbedarf GmbH Würzburg
Zellschaber	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Zentrifuge Universal 2S	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen

**2.1.12 Geräte und sonstige Materialien**

Genpulser	Biorad, München
Heraeus LaminAir® TL 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Kulturröhrchen	Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg
Küvetten	Biorad, München

Petrischalen aus Polystyrol	Greiner und Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
PP-Röhrchen (15 ml/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator, dreistöckig	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttelinkubator, Lab-Therm	Adolf Kühner AG, Schweiz
Schüttler G10 Gyrotory <sup>®</sup> Shaker	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N J, USA
Tischzentrifuge Sigma-3K12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ultrazentrifuge TL 100	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
Vortex VF2	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
Zentrifuge Sorvall RC 5B	Sorvall, Bad Homburg

## 2.2 Mikrobiologische Techniken

### 2.2.1 Kultivierung und Dauerkulturen von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium. Entsprechende Antibiotika wurden dem Medium in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten oder aus Glycerinkulturen angeimpft. Für eine große *E. coli*-Kultur (50-250 ml) wurden die Hauptkulturen in einem Verhältnis von 1:100 mit den Vorkulturen angeimpft. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zur längeren Lagerung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 700 µl 87%igem sterilem Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert.

### 2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Bei der Calciumchlorid-Methode werden die Zellen durch das Calciumchlorid für die Aufnahme von DNA empfänglich gemacht. Dazu wurden 250 ml LB-Medium mit einer *E. coli*-Übernachtskultur im Verhältnis von 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,5-0,6$  geschüttelt. Die Bakterien wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C geerntet. Der Überstand wurde möglichst vollständig dekantiert und der Rückstand in 100 ml eiskalter 100 mM  $MgSO_4$ -Lösung resuspendiert. Anschließend wurde wie zuvor zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 ml eiskalter 100 mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 22 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen. Bis zur ihrer Verwendung wurden 800 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden  $CaCl_2$ -kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Je 200 µl Zellen wurden mit 1 µl einer Plasmid-Minipräparation oder 10 µl eines Ligationsansatzes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem Hitzschock bei 42°C für 2 Minuten ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37°C für 60 min geschüttelt. Danach wurden 100 µl des Ansatzes zur Selektion auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.



## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.3.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* Kultur wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Diese Präparation basiert auf einer alkalischen SDS-Lyse. Die Plasmid-DNA bindet an die Silicagelmatrix der Mini-Säule während Proteine und andere Verunreinigungen die Säule passieren, ohne zu binden. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde mit dem Maxi Kit der Firma Qiagen laut Anleitung präpariert. Diese nutzt die selektive Bindung der DNA an eine Anionenaustausch-Säule. Proteine und RNA eluieren bereits bei mittleren Salzkonzentrationen. Eine Elution der Plasmid-DNA erfolgt dagegen erst bei hohen Salzkonzentrationen.

#### 2.3.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in Agarosegelen. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben gereinigt.

### 2.3.2 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Proteinen aus der DNA-Lösung. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol (25:24:1) vermischt. Zur Trennung der Phasen wurde das Gemisch zentrifugiert (1 min,  $12000 \times g$ , RT). Die obere wässrige Phase wurde entnommen und zur Ethanolfällung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Durch Präzipitation der wässrigen Phase mit Ethanol wurde die DNA konzentriert und teilweise von unerwünschten Salzen befreit. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol. 100% Ethanol gemischt. Anschließend wurde die DNA für 30 min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (10 min,  $12000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde der Niederschlag getrocknet und in 10 mM Tris, pH 8,0 oder H<sub>2</sub>O für 10 min unter Schütteln bei 65°C resuspendiert.

### 2.3.3 Restriktion und Ligation von DNA

In dieser Arbeit wurde der Restriktionsansatz 1-2 h bei der dem Restriktionsenzym entsprechenden optimalen Temperatur in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert. In der Regel wurden pro µg DNA ca. 5 U Enzym eingesetzt.

Die Ligation gespaltener DNA-Fragment erfolgte mit der T4 DNA-Ligase nach Angabe des Herstellers über Nacht bei 16°C oder 4 h bei RT. Das Fragment lag in der Regel in einem 2-5fachen molaren Überschuss gegenüber der Plasmid-DNA vor. Die Ligationsansätze wurden direkt für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

### 2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Die drei Schritte der Reaktion sind die DNA-Denaturierung bei 94°C, Bindung und Hybridisierung eines *Primer*-Paares am 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes bei einer niedrigen Temperatur und schließlich die Synthese der neuen DNA durch die hitzstabile DNA-Polymerase bei 72°C. Diese Reaktionsfolge wird 20-30 mal wiederholt, so dass das gewünschte DNA-Fragment in exponentiell steigender Menge synthetisiert wird.

Zu Amplifizierung der DNA-Fragmente wurden 0,1 pmol des *Templates* mit 5 µl (1/10 Vol.) 10 × Polymerasepuffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 20 pmol pro *Primer* und 1 U Polymerase gemischt. Der PCR Ansatz wurde anschließend mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Die DNA-Amplifizierung wurde innerhalb von 30 Zyklen in einer PCR-Apparatur durchgeführt. Die optimalen Reaktionsbedingungen (Inkubationszeit und -temperatur, Konzentration der einzelnen Komponenten) sind von der jeweiligen *Primer-Template*-Kombination abhängig und müssen für jede Reaktion optimiert werden.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden schließlich mit Hilfe von Qiaquick-Spinsäulen oder über eine präparative Gelelektrophorese mit Hilfe des Gelextraktions-Kits der Firma Qiagen aufgereinigt.

### 2.3.5 Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide

Um ein kurzes, doppelsträngiges DNA-Fragment herzustellen, wurden zwei komplementäre Oligodesoxynukleotide in TE-Puffer gelöst und in gleichen molaren Konzentrationen gemischt. Die Lösung mit den beiden einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden wurde für 10 min auf 94°C erhitzt und langsam im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die so erhaltenen kurzen doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden direkt für weitere Arbeiten eingesetzt.

### 2.3.6 Northern Blot-Analyse der RNA

#### nicht-radioaktive Markierung von Hybridisierungssonden mit Digoxigenin

Das entsprechende DNA-Plasmid wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen linearisiert, über Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung gereinigt. 1 µg der linearisierten und gereinigten DNA wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort in ein Eis-Ethanolbad gestellt. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und nacheinander 2 µl 10 x Hexanukleotidmix, 2 µl dNTP-Markierungsmix (1mM dATP/dCTP/dGTP; 0,65 mM dTTP; 0,35 mM DIG-dUTP), 2 µl Klenow-Puffer und 1 µl Klenow Enzym (2U/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 20 µl aufgefüllt. Nach der Inkubation für mindestens 1 h bei 37 °C, wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 mM) gestoppt. Um die DNA zu fällen, wurden dem Ansatz 2 µl LiCl (4 M) und 60 µl Ethanol (100 %) zugefügt und anschließend für 30 min bei -70 °C inkubiert. Der Präzipitation folgten Waschen mit 70 %-igem Ethanol, Trocknen der DNA und Resuspension in 50 µl TE-Puffer. Die fertige Sonde wurde direkt für *Northern*- oder *Southern Blot*-Analysen eingesetzt oder zunächst bei -20 °C gelagert.

#### Kapillarblot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Probe wurde das Agarosegel kurz (2 s) mittels UV-Licht fixiert. Zur Denaturierung wurde das Gel für 15 min in 1,5 M NaCl- und 0,5 M NaOH-Lösung geschwenkt. Nach anschließender Neutralisation (15 min in 3 M NaCl und 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) wurde das Gel für 15 min in 20 × SSC-Puffer (0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 und 3 M NaCl) äquilibriert. Anschließend wurde die Probe über Kapillarkräfte aus dem Gel auf eine Nylonmembran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Nach erfolgtem Transfer wurde die Probe mittels UV-Licht (3 min; 312 nm) auf der Membran fixiert.

### Hybridisierung mit Dioxygenin-11-dUTP-markierten Sonden

Die Nylonmembran wurde zunächst zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen für mindestens 1 h in 30 mL Hybridisierungsmix (5 x SSC; 0,1% Natriumlauroylsarcosin; 0,02 % SDS; 5 % Magermilchpulver) bei 42°C prähybridisiert. Anschließend wurde die mit Dioxygenin markierte Sonde 10 min bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu vermeiden. Zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran pro 100 cm<sup>2</sup> Fläche in 10 ml Hybridisierungslösung (10-50 ng markierte Sonde/ml) für mindestens 6 h bei 42 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran 20 min in 2 x SSC/0,1 % SDS bei RT, 20 min in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bei RT, 20 min in 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei RT und 20 min in 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 50 °C gewaschen.

### Immunologischer Nachweis (alle Angaben für 100 cm<sup>2</sup> Membranfläche)

Die Membran wurde 1 min in Puffer 1 (100mM Tris/HCl; 150 mM NaCl pH 7,5) und anschließend für 30 min in Puffer 1 mit 0,5 % Magermilchpulver inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff in Puffer 1 erfolgte eine Inkubation mit 4 µl Anti-Dioxygenin-Antikörper-alkalische Phosphatase-Konjugat (Fab-Fragment, 150 U/200 µl) in Puffer 1 für 30 min. Nachfolgend wurde die Membran 2 x 15 min in Puffer 1 gewaschen und 3 min in Puffer 3 (100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; pH 9,5) äquilibriert. Die Messung der Signale erfolgte durch Farbreaktion in Färbelösung (45 µl einer 50 mg/ml NBT-Stammlösung in 70% DMF und 35 µl einer 50 mg/ml BCIP-Stammlösung in DMF in Puffer 3). Die Farbreaktion wurde durch Waschen in 50 ml TE-Puffer gestoppt. Die Membran wurde fotografiert und bei RT getrocknet.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### **2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden 10%ige Trenn- und Sammelgele hergestellt (modifizierte Methode nach Fling & Gregerson, 1986). Folgende Lösungen wurden für die Herstellung von jeweils 6 Gele verwendet:

Trenngele:	10 ml 30% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37:1) 7,5 ml 3M Tris/HCl, pH8,85, 0,4%(w/v) SDS 9 ml H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub> 3 ml 70% (w/v) Saccharose 475 µl 10% (w/v) APS 25 µl TEMED
Sammelgel:	3,33 ml 30% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37:1) 5 ml 0,5M Tris/HCl, pH6,8, 0,4%(w/v) SDS 9,66 ml H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub> 2,04 ml 70% (w/v) Saccharose 317 µl 10% (w/v) APS 13 µl TEMED

Bei der Probenvorbereitung wurden die Ansätze mit 1/4 ihres Volumens 4 × Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Die Proben dürfen auf keinen Fall erhitzt werden, da sonst das Membranprotein aggregiert und in der Geltasche hängen bleibt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel. Anschließend wurde das Gel gefärbt oder für *Western blot*-Analyse auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert.

## 2.4.2 Färbung von SDS-PA-Gelen

### 2.4.2.1 Coomassie-Färbung

Die *Coomassie*-Färbung dient der schnellen, unspezifischen Färbung von Proteinbanden im SDS-Polyacrylamid-Gel. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in *Coomassie*-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde der nichtgebundene Farbstoff durch die Entfärbelösung aus dem Gel herausgewaschen, bis die Proteinbanden ohne Hintergrund gut zu sehen waren.

### 2.4.2.2 Silber-Färbung

Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit. Es wurde folgendes Färbeprotokoll verwendet:

---

Fixierung	16 min	30% (v/v) Ethanol, 10% Essigsäure
Konditionierung	16 min	2 ml 25% Glutaraldehyd, 0,1 g Natriumdithiosulfat ad 100 ml mit 0,4 Natriumacetat, 30% (v/v) Ethanol
Waschen	3 × 10 min	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Färben	20 min	0,1 g Silbernitrat, 25 µl Formaldehyd (37% (w/v)) ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Entwickeln	1-5 min	2,5 g Natriumcarbonat, 40 µl Formaldehyd (37% (w/v)) ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest.
Stoppen	≥ 10 min	50 mM EDTA, pH7,5

#### **2.4.3 Western Blot Analyse**

Die mittels Polyacrylamidgelelektrophorese getrennten Proteine wurden elektrochemisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen wurden durch Inkubation im Tween 20-haltigen Puffer, der mit Magemilchpulver oder BSA angesetzt wird, abgesättigt. Die Membrane wurde mit dem Erstantikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist, inkubiert. Der Nachweis der Bindung des Erstantikörpers erfolgt generell mittels Bindung eines Zweitantikörpers, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist und mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt wurde. In Gegenwart des Substrats BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) und NBT (Nitroblautetrazolium) bewirkt die alkalische Phosphatase durch Abspaltung der Phosphatgruppe eine bläulich-violette Verfärbung auf der Membran. Biotinylierte Proteinen konnten in einem einstufigen Verfahren nachgewiesen werden, wobei an alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin verwendet wurde.

#### 2.4.4 Benzonase<sup>TM</sup>-Behandlung

Die Lyse von Säugerzellen setzt sehr viel chromosomale DNA frei, die vor der Gelelektrophorese zerkleinert werden muss. Zur Spaltung der DNA wurde Benzonase<sup>TM</sup> eingesetzt, eine Nuklease aus *Serratia marcescens*, die sämtliche Arten von DNA und RNA zu kleinen Oligonukleotiden von drei bis fünf Basenpaaren zerstückelt und auch in Gegenwart von 4 M Harnstoff, 100 mM 2-Mercaptoethanol oder verschiedenen Detergenzien noch zu fast 100% aktiv ist. Die Zellen wurden in Laemmli-Auftragspuffer lysiert. Anschließend wurde MgCl<sub>2</sub> zugegeben (Endkonz. 1 mM) und mit 10 U Benzonase<sup>TM</sup> pro 100 000 Zellen bei 4°C für 15 min inkubiert. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Polyacrylamidgel 5 min bei 4°C mit 14000 upm zentrifugiert.

#### 2.4.5 Enzymatische Deglykosylierung

Enzymatische Deglykosylierungen wurden mit den Enzymen Peptid-N4-(N-acetyl- $\beta$ -glucosaminyl)asparaginamidase (N-Glycopeptidase F, PNGase F, EC 3.2.2.18) und Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (Endo H, EC 3.2.1.96) durchgeführt.

Zur Deglykosylierung mit Endo H wurden die Rohmembranen bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in 40 mM Natriumcitrat pH 5,5, 0,1% SDS, 2 mM PMSF und 0,14 U/ml Endo H für 3 h bei 37°C inkubiert. Bei der Deglykosylierung mit PNGase F wurden 3 mg/ml Membranen in 50 mM Natriumphosphat pH 7,5 mit 100 U/ $\mu$ l PNGase F für 30 min bei 37°C inkubiert. In Kontrollansätzen wurden die Membranen jeweils identisch behandelt, jedoch ohne Zugabe von Enzymen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1/3 Volumen 4  $\times$  Laemmli-Auftragspuffer gestoppt und die Proben durch SDS-PAGE immunologisch mittels *Western Blot* analysiert.

### 2.5 Säulenchromatografische Methoden

#### 2.5.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das Prinzip dieser Chromatographie beruht auf der reversiblen, spezifischen Bindung der Aminosäureseitenketten, insbesondere von Histidin an zweiwertigen Metallionen (Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>,

$\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), die durch Komplexierung an einen chelierenden Liganden der stationären Phase immobilisiert sind.

Nicht gebundene Proteine werden durch Waschen mit Puffer entfernt. Gebundene Proteine können durch folgende Methoden eluiert werden: (1) Senkung des pH-Wertes, sodass die Histidinreste im Protein positiv geladen werden und damit nicht mehr mit den Metallionen wechselwirken; (2) Zugabe steigender Konzentrationen von Imidazol oder Histidin, die mit dem Protein um die Metall-Bindung konkurrieren.

Zur Aufreinigung des rekombinanten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde in dieser Arbeit ein Dekahistidinhängsel an den C-Terminus des Rezeptors fusioniert. Der Rezeptor wurde wie in 2.8.6 beschrieben aus Säugerzellmembran solubilisiert, das Solubilisat auf eine Imidazol-Konzentration von 20 mM eingestellt. Das Säulenmaterial (in dieser Arbeit Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen) wurde zunächst mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und mit Äquilibrationpuffer äquilibriert. Das Solubilisat wurde auf die Säule gegeben. Anschließend wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit Äquilibrationpuffer entfernt. Dabei wurde die Säule mit Waschpuffer so lang gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm den Basiswert erreicht hatte. Die Elution erfolgte in den ersten Läufen über einen linearen Imidazol-Gradient (0-500 mM). Die daraus ermittelten Kenntnisse wurden als Grundlage für die nachfolgende Aufreinigung genutzt. Die einzelnen Fraktionen der Chromatographie wurden durch SDS-PAGE und Ligandenbindungstest analysiert.

Äquilibrationpuffer	Hepes-Puffer pH 7,4
	0,1% <i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
	10 mM Imidazol
Waschpuffer	Hepes-Puffer pH 7,4
	0,1% <i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
	40 mM Imidazol

### 2.5.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltration dient dazu, Proteine der Größe nach aufzutrennen. Dazu verwendet man ein poröses Säulenmaterial. Die Auftrennung erfolgt, weil kleinere Moleküle in die Poren eindringen und ihre Passage durch die Säule verzögert wird, während größere Moleküle, die



auf Grund ihrer Größe vom Eindringen in die Poren ausgeschlossen werden, schneller mit der mobilen Phase durch die Säule hindurchwandern.

Zur Analyse der Dispersität des gereinigten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde eine Gelfiltrationsuntersuchung in einem Smart<sup>TM</sup> Chromatographiesystem (Pharmacia, Schweden) durchgeführt. Hierbei wurde entweder eine Superose<sup>®</sup> 6 PC 3.2/30 oder eine Superose<sup>®</sup> 12 PC 3.2/30-Säule verwendet. Als Puffer wurde Hepes-Puffer mit 0,05-0,1% *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid verwendet, die Flussrate betrug 50  $\mu$ l/min, die Temperatur 4 °C. Das Probevolumen betrug 50  $\mu$ l. Es wurden 100  $\mu$ l Fraktionen gesammelt und diese auf spezifische Ligandenbindung und nach Auftrennung im SDS-PAGE durch Silberfärbung untersucht.

## 2.6 Radioligandenbindungstest

Um die bindungsfähige Rezeptorpopulation vollständig zu erfassen, muss der Radioligand in mehrfachem Überschuss ( $10 \times K_D$ ) eingesetzt werden. Zur Abtrennung des freien Liganden wurden die im folgenden beschriebenen Filtrations- oder Gelfiltrationsverfahren verwendet.

### 2.6.1 PEI/Filtrationstest zur Messung des membrangebundenen $\beta_2$ adrenergen Rezeptors

Zur Bestimmung des membrangebundenen Rezeptors wurden 10-50  $\mu$ g Membranprotein mit  $\geq 5$  nM [<sup>3</sup>H] CGP-12177 in Hepes-Puffer 30 min bei 30°C in einem Volumen von 500  $\mu$ l inkubiert. Anschließend wurden die Proben über einen in 0,3 % PEI (Polyethylenimid) getränkten Glasfaserfilter filtriert. Die Filter wurden dreimal mit 4 ml kaltem Wasser gewaschen und zusammen mit 4,5 ml Szintillationscocktail in Szintillationsfläschchen überführt. Die Ligandenbindung wurde in einem Szintillationszähler gezählt. Für jede Membranprobe wurden 5 Messungen durchgeführt. Zwei davon wurden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung mit 2 mM Alprenolol versetzt.

### 2.6.2 Gelfiltrationstest zur Messung des solubilisierten $\beta_2$ adrenergen Rezeptors

Der Gelfiltrationstest wurde nach Caron und Lefkowitz (1976) durchgeführt. Dazu wurden 20  $\mu$ l Solubilisat in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l in Hepes-Puffer mit 5-10 nM [<sup>3</sup>H] CGP-12177, 0,1 % *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, 0,0024 % Cholesterollhemisuccinat und 0,006 %

Phosphatidylcholin 30 min bei 30°C inkubiert. Die Testgemische wurde auf eine Sephadex G-50 M Säule aufgetragen und anschließend mit 500 µl eiskaltem Hepes-Puffer gewaschen. Der Rezeptor wurde mit 900 µl eiskaltem Hepes-Puffer eluiert. Das Ausschlussvolumen wurden gesammelt und im Szintillationszähler nach Zugabe von 3,5 ml Szintillationscocktail gemessen.

### **2.6.3 Ligandenbindungstest zur Bestimmung der maximal bindungsfähigen Rezeptorpopulation an Zellen**

Die Zellen aus 24-Well-Kulturschalen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in DMEM Medium mit 5 nM [<sup>3</sup>H] CGP-12177 45 min bei 37°C inkubiert. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde 4 mM Alprenolol zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Kulturschalen auf Eis gelegt und die Zellen 3 × mit eiskalter PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde zu jeder Vertiefung 1 ml 0,5 N NaOH gegeben und 2-3 h bei 37°C inkubiert. Zur Neutralisierung wurden jeweils 30 µl Eisessigsäure gegeben. Die gesamte Probe wurde mit 3 ml Szintillationscocktail gemischt und im Szintillationszähler gemessen.

## **2.7 Zellkulturmethoden**

Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien und die mit den Zellen durchgeführten Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, generell bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100%. Der erhöhte CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft dient mit dem im Medium enthaltenen Natriumhydrogencarbonat als Puffersystem zur Stabilisierung des pH-Wertes, was aufgrund der entstehenden Stoffwechselprodukte CO<sub>2</sub>, Ammonium und Lactat erforderlich war.

### **2.7.1 Anlegen und Passagieren von Kulturen adhärenter Zellen**

Zur Kultivierung von adhärenenten Zelllinien wurden Gewebekulturflaschen und –schalen verwendet. Die verwendeten Kulturflaschen und –schalen besaßen eine behandelte Oberfläche, um den Zellen das Anheften auf der Kunststoffoberfläche zu ermöglichen.

Wenn die adhärenenten Zellen einen hohen Konfluenzgrad erreichten, kommt es zum Wachstumsstillstand aufgrund der sogenannten Kontaktinhibition. Zur Generierung von

Subkulturen wurde das alte Medium verworfen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer 175 cm<sup>2</sup> Flasche durch 3-minütige Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und in 10 ml Zellkulturmedium suspendiert. Die Zugabe von Kulturmedium bewirkt eine Inaktivierung der Trypsin/EDTA-Lösung. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer und neue Kulturen konnten angeimpft werden. Dabei wurden  $1,5 \times 10^6$  BHK-Zellen in 30 ml Medium in einer frischen 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät. Die Subkultivierung der Zellen zur Stammhaltung erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von  $0,5-1 \times 10^7$  Zellen/ml in Medium mit 10% (v/v) DMSO schrittweise bis zu  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Gefrierkulturen bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad erwärmt und anschließend in entsprechendem Medium kultiviert.

### **2.7.2 Anlegen und Passagieren von Suspensionskulturen in Spinnerflaschen**

Zur Kultivierung von Säugerzellen in Suspension wurden Spinnerflaschen verwendet. Suspensionskulturen wurden unter den gleichen Inkubationsbedingungen bei einer Durchmischungsgeschwindigkeit von 90 upm kultiviert. Für das Anlegen einer Suspensionskultur ist eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml erforderlich. Bei einer Dichte von  $1,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  wurden die Zellen passagiert. Für den Mediumwechsel wurden die Suspensionskulturen bei  $600 \times g$  für 10 min (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag mit neuem Medium resuspendiert.

### **2.7.3 Viabilitätstest mit Trypanblau**

Zur Beurteilung der Viabilität einer Kultur wurde ein Kulturaliquot mit dem  $0,1 \times$  Volumen einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gemischt und nach 2 min die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. In tote Zellen dringt der Farbstoff Trypanblau ein und färbt sie blau, gesunde Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Eine gesunde Kultur enthält ca. 97-98% farblose, d.h. lebende Zellen.

## 2.8 Proteinproduktion mit dem *Semliki Forest Virus*

### 2.8.1 *In vitro* Transkription

Zur Erzeugung großer Mengen hochspezifischer und biologisch aktiver RNA wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt. Diese wurde über einen im pSFV-Vektor vorliegenden SP6-Promotor ermöglicht und erfolgte mit linearisiertem Plasmid. Bei der Linearisierung kamen die Restriktionsenzyme *SpeI* (für Helper2 Vektor) und *NruI* (für Expressionsvektoren) zum Einsatz. Anschließend wurde die DNA über eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung gereinigt. Für eine 50 µl *in vitro* Transkriptionsreaktion wurden angesetzt:

Linearisiertes Plasmid 0,5 µg/µl	5 µl
10 × SP6-Puffer	5 µl
m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G (CAP) 10 mM	5 µl
DTT 50 mM	5 µl
rNTP-Mix (ATP, CTP, UTP 10 mM; GTP 5 mM)	5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	18,5 µl
RNAasin (40 U/µl)	1,5 µl
SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl)	5 µl

Der Reaktionsmix wurde bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach wurde 1 µl des Reaktionsansatzes in einem 0,8 % Agarosegel analysiert. Die RNA wurde anschließend direkt für die Elektroporation der BHK Zellen eingesetzt.

### 2.8.2 Transfektion der Säugerzellen mittels Elektroporation

Die Zellen für die Elektroporation sollten sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Dazu wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 90% durch Behandlung mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und in Medium suspendiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 500 g wurden die Zellen sedimentiert. Der Niederschlag wurde einmal mit PBS gewaschen und schließlich so suspendiert, dass eine für die Elektroporation optimale Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht wurde. Pro Elektroporation wurden 400 µl dieser Zellsuspension in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben. Sofort wurden 50 µl *in vitro*

Transkriptionsansatz der rekombinanten RNA mit 25 µl der Helper2-RNA dazu pipettiert und gründlich vermischt. Die Elektroporation erfolgte in zwei direkt aufeinander folgenden Pulsen bei einer Spannung von 1,5 kV und einer Kapazität von 25 µF. Der Widerstand wurde dabei auf unendlich eingestellt. Die Zeitkonstante betrug pro Puls 0,7 ms. Die transfizierten Zellen wurden anschließend mit 10 ml Medium versetzt und in einer 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche ausgesät und in einem Inkubator für 24 h inkubiert.

### **2.8.3 Ernte und Aktivierung der rekombinanten Viren**

Nach 24 h Produktionszeit (s.2.8.2) wurden die Viren geerntet. Da die Viren von den transfizierten Zellen ins Medium sekretiert wurden, konnten diese durch Abgießen des Mediums in einem Falconröhrchen gesammelt werden. Es folgte ein 10 Minuten langer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 upm zur Abtrennung von zellulären Bestandteilen. Die Virusstocks wurden generell über einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert und bei –80°C gelagert oder direkt für die Infektion eingesetzt.

Die Aktivierung des Virusstocks erfolgte bei 37°C über eine 15-minütige Inkubation mit 1/40 Vol. einer α-Chymotrypsin-Lösung (20 mg/ml). Anschließend wurde das α-Chymotrypsin mit 1/40 Vol. des Proteaseinhibitors Aprotinin (10 mg/ml) inaktiviert. Die aktivierten Virusstocks wurden direkt zur Infektion eingesetzt.

### **2.8.4 Infektion und Ernten der Zellen**

Die Zellen in einer 175 cm<sup>2</sup> Flasche wurden nach Entfernung des Mediums mit 10 ml PBS gewaschen. Die zur Infektion eingesetzte Viruslösung wurde mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und zu den Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte über eine einstündige Inkubation der Zellen bei 37°C. Danach wurde die Viruslösung entfernt. Nach Zugabe von 30 ml frischem Medium wurden die Zellen weitere 24 h inkubiert und am folgenden Tag mit einem Zellschaber oder durch Abspülen mit einer Pipette geerntet.

Größere Mengen an rekombinantem Protein wurden durch die Infektion von Suspensionskulturen produziert. Kulturen mit einer Zelldichte von  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden 10 min bei 500 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1/5 des ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert und mit rekombinanten Viren infiziert. Nach der Inkubation unter leichtem Rühren für 1 Stunde wurde die Zellsuspension mit frischem Medium auf das ursprüngliche Kulturvolumen aufgefüllt und weiter inkubiert. Zum Zeitpunkt der maximalen

Proteinproduktion (20-40 h nach der Infektion) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10 min bei 500 g und 4°C). Der Niederschlag wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

### 2.8.5 Bestimmung des Virustiters

In dieser Arbeit wurde bei der Herstellung rekombinanter Virenpartikel je ein Kontrollansatz mit dem Konstrukt SFV-GFP oder SFV- $\beta_2$ ARGFP durchgeführt. Zur Bestimmung des rekombinanten Virustiters wurden jeweils 10000 BHK-21-Zellen in die Vertiefungen von Nunclon™ $\Delta$ -Multischalen mit 96 Vertiefungen gesät und mit verschiedenen Verdünnungen ( $10^{-1}$ – $10^{-10}$ ) der Viren SFV3GFP oder SFV3 $\beta_2$ ARGFP infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurde der Titer dieser Viren durch Auszählen der positiven Zellen (grünfluoreszierenden) bestimmt. Für die parallel hergestellten Viruslösungen wurde ein Titer mit gleicher Konzentration angenommen.

### 2.8.6 Zellaufschluss und Membranpräparation

#### 2.8.6.1 Zellaufschluss mit Glasperlen

Bei der Optimierung der Expression in Säugerzellen wurden Membranen in analytischem Maßstab präpariert.  $15\text{--}25 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH7,4, 1mM EDTA, 5% Glycerin, 50  $\mu\text{g/ml}$  Bacitracin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 1 mM PMSF, Pepstatin A 1  $\mu\text{g/ml}$ ) suspendiert und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Zu der Zellsuspension wurden ca. 700  $\mu\text{l}$  Glasperlen und Proteaseinhibitoren zugegeben. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß auf einen Schüttler gespannt und bei maximaler Einstellung für 10 min bei 4°C geschüttelt. Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 4 °C und 500 g abgetrennt (*Low-Spin*). Der Überstand wurden mit 100000 g für 45 min bei 4°C zentrifugiert (*High-Spin*). Das Membransediment wurde mittels Potter-Homogenisator in 0,5 ml Hepes-Puffer (s. 2.1.3) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –75°C gelagert.

### **2.8.6.2 Zellaufschluss mit der Parr-Bombe**

Für die Membranpräparation im großen Maßstab wurden die Zellen in Suspensionskultur infiziert. Hierbei wurden Kulturvolumina von 500 bis 1000 ml mit einer Zelldichte von  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und in etwa 1/20 des Kulturvolumens (zu ca.  $20 \times 10^6$  Zellen/ml) in Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH7,4, 1mM EDTA, 5% Glycerin, 50 µg/ml Bacitracin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, Pepstatin A 1 µg/ml) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4°C. Die Zellsuspension wurde in der Parr-Bombe bei einem Überdruck von 3,4 MPa unter Stickstoff für 45 min inkubiert. Durch einen kontrolliert eingeleiteten Druckabfall wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Aufschluss suspension wurde für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in 45Ti-Röhrchen überführt. Die Ultrazentrifugation erfolgte mit 100 000 g für 2 h bei 4 °C. Die erhaltenen Membranen wurden mit Hilfe des Potter-Homogenisators in Hepes-Puffer (s. 2.1.3) suspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -75°C gelagert.

### **2.8.6.3 Zellaufschluss mit der French Press**

Die French Press besteht aus einem Zylinder mit einem zur Zylinderwand abgedichteten Kolben. Am Grund des Zylinders befindet sich eine Bohrung mit geringem Durchmesser, die durch ein Reduzierorgan in ihrem Querschnitt verengt wird. Zum Zellaufschluß wird die Zellsuspension blasenfrei in den vorgekühlten Zylinderraum eingefüllt. Bei verschlossener Auslassbohrung wurde der Kolben mittels Hochdruckhydraulikpresse auf den gewünschten Druck (bis zu 2000 bar) eingestellt. Sobald dieser erreicht war, wurde das Ventil soweit geöffnet, dass die Suspension mit geringem Volumenstrom austrat. Durch die plötzliche Expansion der unter einem Druck von 2000 bar gegen Normaldruck stehenden Zellsuspension wurde die Zellwand aufgerissen. Die Zellsuspension wurde 2 Kompressions-Dekompressionszyklen unterworfen. Die Zentrifugation und Isolation der Membranen erfolgte wie unter 2.8.6.2 beschrieben.

### **2.8.7 Solubilisierung des $\beta_2$ adrenergen Rezeptors aus Säugerzellen Membranen**

Die Membranen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit Hepes-Puffer (s. 2.1.3) auf eine Proteinkonzentration von 2-5 mg/ml eingestellt. Zur Solubilisierung der Membranproteine

wurde die Detergenzkonzentration durch Zugabe von n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid auf 1,5 % eingestellt und 2 h bei 4°C leicht schwenkend inkubiert. Im Anschluss folgte eine Ultrazentrifugation bei 100 000 g für 45 min bei 4°C. Danach wurde der Überstand abgenommen und weiterverarbeitet.

### **2.8.8 Messung der cAMP-Akkumulation in Säugerzellen**

Zur Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden die Zellen durch Inkubation in 0,1 M HCl lysiert. Nach der Neutralisation mit NaOH wurde das Lysat 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die cAMP-Messung eingesetzt. Die cAMP-Messungen erfolgten mit dem kommerziell erhältlichen cAMP Enzyme Immunoassay Kit (Firma Biotrend Chemikalien, Köln). Das Prinzip des Assays beruht auf der Fähigkeit der Komplexbildung zwischen Antigen (cAMP) und einem anti-cAMP-Antikörper. Das in der Probe vorhandene cAMP konkurriert mit einem der Probe zugesetzten cAMP, das an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, um die Bindung an den im Überschuss vorhandenen anti-cAMP-Antikörper. Je mehr cAMP in der Probe ist, desto weniger alkalische Phosphatase-markiertes cAMP kann an den Antikörper gebunden werden. Nach einer Aquilibrierungsphase wird der anti-cAMP-Antikörper von einem an der Oberfläche einer 96-Wells-Plate immobilisierten zweiten Antikörper gebunden und der Überstand mit dem nichtgebundenen cAMP vollständig entfernt. Anschließend wird Substrat der alkalischen Phosphatase zugegeben und die Intensität der Farbreaktion bei 405 nm gemessen. Die Intensität korreliert invers mit der Konzentration von cAMP in der Probe.

Die wichtigsten Parameter für die Rezeptorproduktion mit anschließender cAMP-Messung, wie z.B. die MOI, die Infektionsdauer, die Konzentration von Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin, die HCl-Konzentration zur Zelllyse, mussten in Vorversuchen bestimmt und optimiert werden. Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Das *Semliki Forest Virus* (SFV)-Expressionssystem besteht aus zwei Komponenten, einem Expressionsvektor und einem Helferplasmid. Die vom SFV abgeleiteten Expressionsvektoren werden als pSFV 1, 2 oder 3 bezeichnet. Sie unterscheiden sich voneinander nur durch ihre multiple Klonierungsstelle (MCS). Eine schematische Darstellung der Expressionsvektoren und der *Polylinker*-region ist in Abb. 3.1 wiedergegeben.

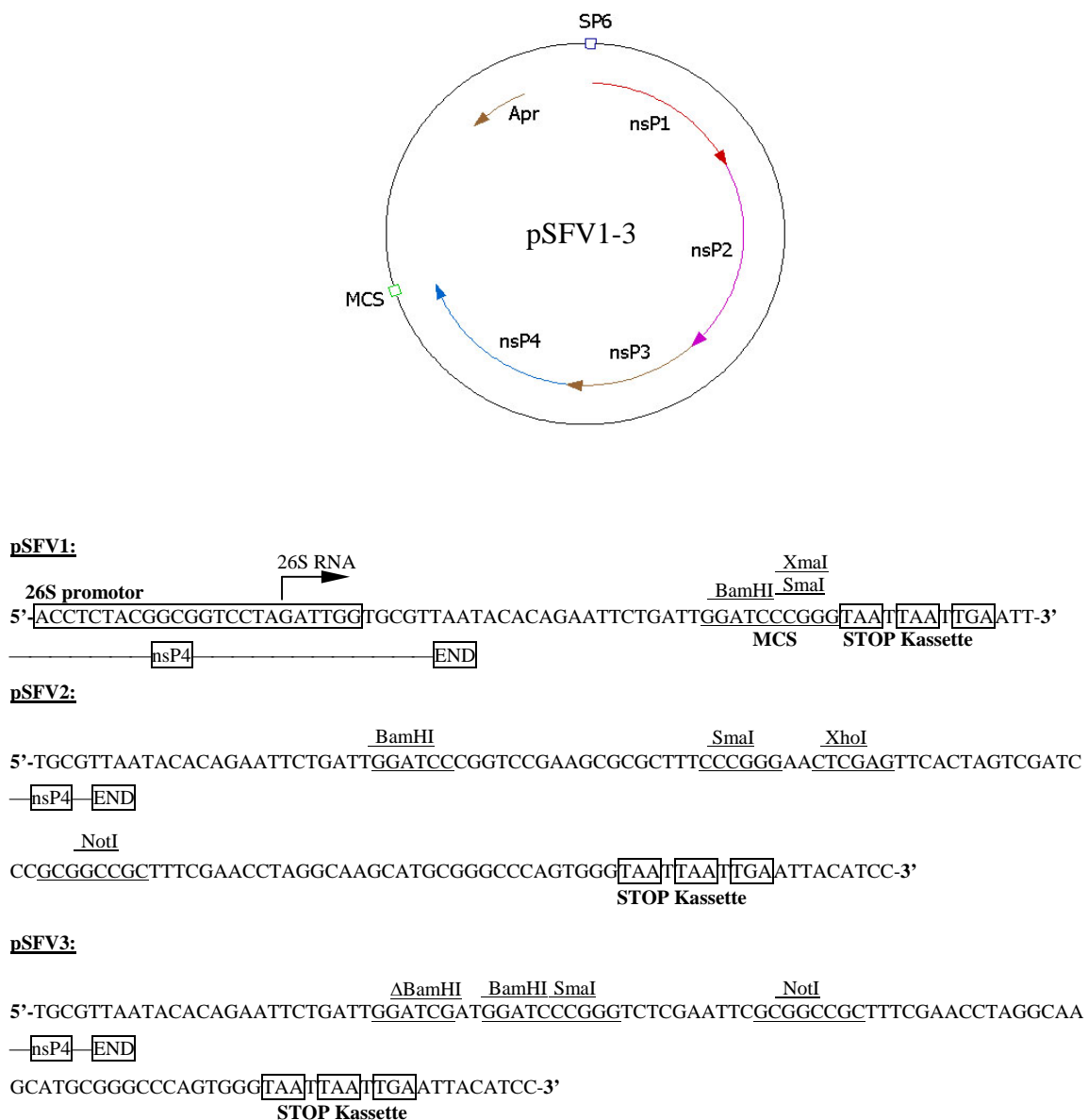


Abb. 3.1: *Polylinker*-region der SFV-Konstrukte pSFV1, 2 und 3 (nach Liljeström & Garoff, 1991). Apr: Ampicillinresistenzgen; nsP: Nichtstrukturgene; SP6: SP6-Promotor für die *in vitro* Synthese von RNA-Transkripten des Vektors; MCS: multiple Klonierungsstelle.

Zur Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurden in dieser Arbeit sieben verschiedene rekombinante *Semliki Forest* Viren hergestellt. Für die Herstellung dieser Viren wurden sieben Expressions-Vektoren und ein pSFV-Helper2-Plasmid verwendet. Die Expressionsvektoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- Vektoren, die sich von Basisvektor pSFV2gen ableiten.
- Vektoren, die sich von Basisvektor pSFV2CAP ableiten.

Alle Konstrukte, die für die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors im SFV-Expressionssystem kloniert wurden, sind in Abb. 3.2 dargestellt.

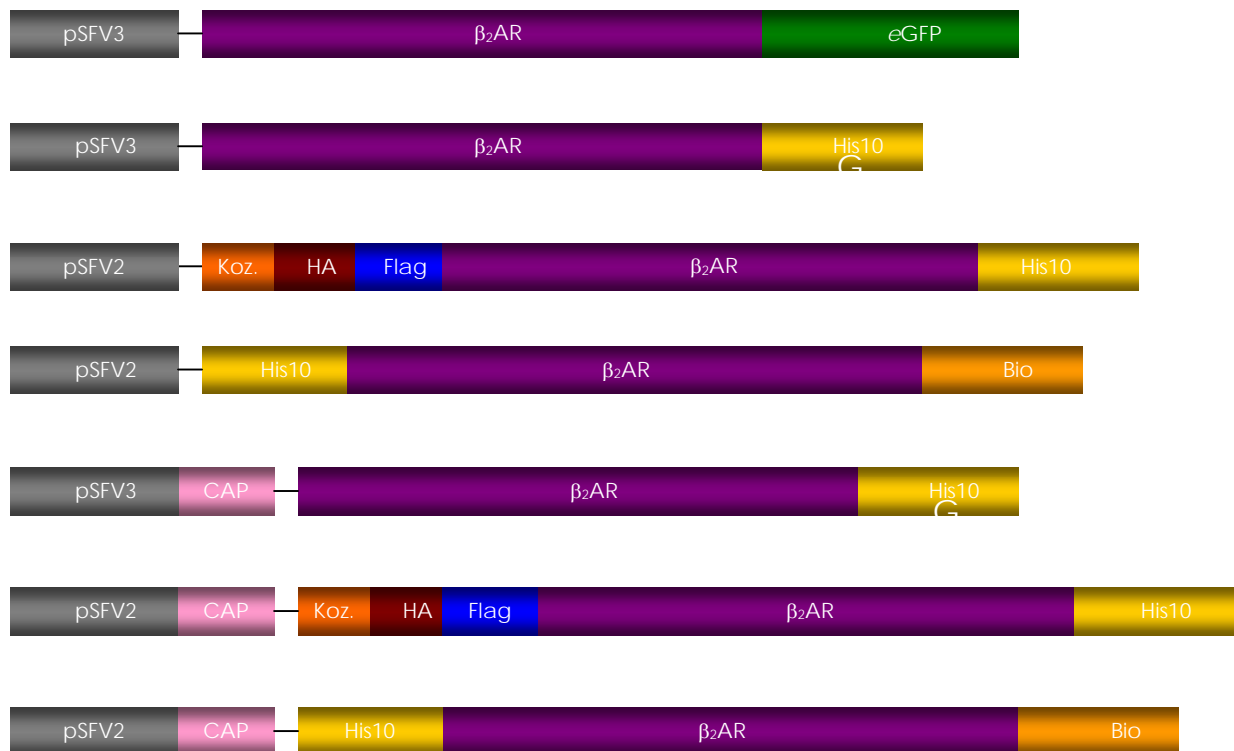


Abb. 3.2: Übersicht über die Expressionsvektoren zur Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors im SFV-Expressionssystem. eGFP: Kodierregion für das „enhanced green fluorescent protein“ aus *Aequorea victoria*; His 10: 10  $\times$  Histidine; Koz.: Kozak-Sequenz; HA: Kodierregion des Signalpeptids aus dem Hämagglutinin-Protein des Influenza-Virus; Flag: Kodierregion des Flag-Peptids; Bio: Sequenz für die Biotinylierungsdomäne der Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii*.

### Konstruktion der Expressionsvektoren basierend auf pSFV2gen:

Der Vektor pSFV2gen ist freundlicherweise von Kenneth Lundstrom (*Bio-Xtal*, Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt worden. Dieser Vektor ist die Grundlage für viele Expressionsvektoren.

Der Vektor pSFV2gen wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Not*I geöffnet und die hybridisierten Oligonucleotide pSFV2CAP<sub>for</sub> + pSFV2CAP<sub>rev</sub> eingefügt. Der erhaltene Vektor wurde als pSFV3 bezeichnet (Abb. 3.3).

### MCS in Vektor pSFV2 bzw. pSFV2CAP:

$$\begin{array}{c}
 \text{BamHI} \qquad \qquad \qquad \text{NotI} \\
 \text{5' - GGA TCC CGG TCC GAA GCG CGC TTT CCC GGG AAC TCG AGT TCA CTA GTC GAT CCC GCG GCC GC -3'}
 \end{array}$$

### MCS in Vektor pSFV3 bzw. pSFV3CAP:

$$\begin{array}{c}
 \text{BamHI} \qquad \qquad \qquad \text{NotI} \\
 \text{5' - GGA TCG ATG GAT CCC GGG TCT CGA ATT CGC GGC CGC -3'}
 \end{array}$$

Abb. 3.3: Leserasterverschiebung in MCS um eine Stelle von GGA in pSFV2 und pSFV2CAP auf GAT in pSFV3 und pSFV3CAP.

Der Vektor pSFV3 $\beta_2$ ARGFP ist freundlicherweise von Dr. C. Reinhart (MPI für Biophysik, Frankfurt a.M.) zur Verfügung gestellt worden. Im kodierten Protein wurde der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor mit dem modifizierten „enhanced“ grün fluoreszierenden Protein (eGFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* C-terminal fusioniert. Aufgrund seiner spektroskopischen Eigenschaften (Anregung bei 490 nm, Emission bei 510 nm) kann das  $\beta_2$ ARGFP-Fusionsprotein mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken *in vivo* sichtbar gemacht werden. Das eGFP kann auch mit einem anti-GFP Antikörper im *Western Blot* nachgewiesen werden.

Im Vektor pSFV3 $\beta_2$ ARHis wurde das Gen des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit einer für 10 Histidine kodierenden Sequenz fusioniert. Das Dekahistidinanhängsel sollte zur Anreicherung der Rezeptoren mittels Metallchelatchromatographie genutzt werden. Als Ausgangskonstrukt diente der *Pichia pastoris*-Expressionsvektor pPIC9KFlagHis $\beta_2$ ARBio (Dr. C. Reinhart, MPI für Biophysik). Das Fragment Bio wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Not*I aus dem Vektor herausgeschnitten. In den geschnittenen Vektor wurden die hybridisierten Oligonucleotide His10<sub>for</sub> + His10<sub>rev</sub> ligiert. Aus dem erhaltenen Konstrukt wurde das

Fragment  $\beta_2$ ARHis *Bam*HI/*Not*I herausgeschnitten und abschließend über die selben Schnittstellen in den Vektor pSFV3 hinein ligiert. Der erhaltene Vektor pSFV3 $\beta_2$ ARHis wurde über Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft und für die *in vitro* Transkription mit der Restriktionsendonuklease *Nru*I linearisiert.

Der Vektor pSFV2KHAFlag $\beta_2$ ARHis kodiert für ein Fusionsprotein, das neben dem Signalpeptid aus dem Hämagglutinin (HA)-Protein des Influenza-Virus, dem Flag-Epitop und dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor noch ein Dekahistidinanhängsel enthält. Das HA-Signalpeptid sollte die Insertion des Rezeptors in die Membran verbessern und so die Produktion steigern. Vor dem Start-Codon wurde noch eine „Kozak-Sequenz“ zur Erhöhung der Translationseffizienz eingefügt. Zur Konstruktion dieses Vektors wurde zuerst der Vektor pSFV2gen mit den Enzyme *Bam*HI und *Xho*I geöffnet. Ein Stück doppelsträngige DNA, das für die Influenza HA-Signalsequenz sowie für das Flag-Epitop codiert, wurde über *Bam*HI/*Xho*I eingefügt. Durch Einfügen dieses Fragments wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle im Ursprungsvektor deletiert und hinter der Sequenz für das Flag-Peptid wieder eingeführt. In diesen neuen Vektor wurde das Fragment  $\beta_2$ ARHis *Bam*HI/*Not*I eingefügt.

Der Vektor pSFV2His $\beta_2$ ARBio kodiert für ein Fusionsprotein aus einem N-terminalen Dekahistidinpeptid, der Biotinylierungsdomäne der Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii* und dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor. Die Biotinylierungsdomäne sollte über ihre Bindung an Streptavidin bzw. Monomeres Avidin zum Nachweis und zur Reinigung verwendet werden. Aus dem Plasmid pPIC9KFlagHis $\beta_2$ ARBio wurde das His10 $\beta_2$ ARBio *Bam*HI/*Not*I- Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pSFV2gen ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft und anschließend für die *in vitro* Transkription linearisiert.

#### Konstruktion der Expressionsvektoren basierend auf pSFV3CAP:

Das Gen des Kapsid-Proteins aus dem Genom des *Semliki-Forest-Virus* enthält eine *translational enhancer*-Sequenz am 5'-Ende, die das Expressionsniveau von rekombinantem Protein stark (bis zu 10 fach) erhöhen kann (Lundstrom *et al.* 2001). Außerdem weist das Kapsid-Protein eine autokatalytische Spaltungsaktivität auf, die sich nach der Translation von dem rekombinanten Protein wirksam trennen kann.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese *translational Enhancer*-Sequenz sich positiv auf die Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors auswirkte. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pSFV3CAP konstruiert. Aus dem Vektor pSFV2gen wurde ein Fragment

*Bam*HI/*Xba*I herausgeschnitten und gegen das ebenfalls mit den Endonukleasen *Bam*HI/*Xba*I geschnittene Fragment aus dem Vektor pSFV1CAP ersetzt. Der resultierende Vektor pSFV2CAP wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Not*I geöffnet und die hybridisierten Oligonukleotide pSFV2CAP<sub>for</sub> + pSFV2CAP<sub>rev</sub> eingefügt. Der erhaltene Vektor wurde als pSFV3Cap bezeichnet, dessen Unterschied zu pSFV2CAP im Leseraster der MCS liegt (Abb. 3.3).

In den Vektor pSFV3CAP wurde das Fragment  $\beta_2$ ARHis aus dem Vektor pSFV3 $\beta_2$ ARHis *Bam*HI/*Not*I eingefügt. Das Ergebnis war der Vektor pSFV3CAP $\beta_2$ ARHis. Zu Konstruktion des Vektors pSFV2CAPHis $\beta_2$ ARBio wurde in den mit *Bam*HI/*Not*I geöffneten Vektor pSFV2CAP ein *Bam*HI/*Not*I Fragment aus dem Vektor pSFV2His $\beta_2$ ARBio ligiert. Die Vektoren pSFV3CAP $\beta_2$ ARHis und pSFV2CAPHis $\beta_2$ ARBio entsprechen den Vektoren pSFV3 $\beta_2$ ARHis und pSFV2His $\beta_2$ ARBio mit dem Unterschied, dass die Expression des Rezeptors unter dem Einfluss des Kapsid-Proteins steht.

### 3.2 *in vitro* Transkription

Für die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen wurde von den Expressionsplasmiden und Helferplasmiden durch *in vitro* Transkription mRNA hergestellt. Die Qualität der Transkripte wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel überprüft. Abbildung 3.4 zeigt ein Agarosegel der *in vitro* Transkripte.

Die Laufhöhe der  $\beta_2$ ARHis10-SFV-RNA (9461 Bp) entspricht etwa der eines 2000-Basenpaar-DNA-Fragments und die der Helfer2-RNA (5413 Bp) der eines 1500-Basenpaar-DNA-Fragments. Eine RNase-Kontamination lag nicht vor, da die RNA gut abgegrenzte Banden bildeten und keine Fragmente sichtbar waren. Weiterhin wiesen beide Banden die gleiche Intensität auf, was auf vergleichbare Ausbeuten bei der *in vitro* Transkription schließen ließ. In einigen Fällen waren Banden unterhalb der Hauptbanden zu beobachten. Sie sind möglicherweise unvollständige Produkte der *in vitro* Transkription, die bei Reaktionsabbrüchen entstehen können. Die Ursache für die Reaktionsabbrüche kann ein bei großen Transkripten auftretender NTP-Mangel sein (s. Kap. 3.4.1).

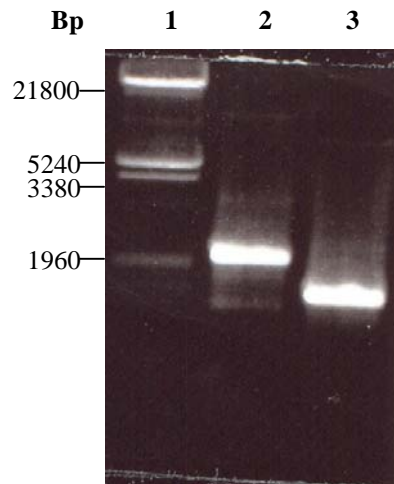


Abb. 3.4: Agarosegel zur Analyse der *in vitro* Transkription. Die Vektoren wurden linearisiert, gereinigt und 2,5 µg zur *in vitro* Transkription mit Hilfe der SP6 RNA-Polymerase eingesetzt. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wurden pro Spur 1 µl des Reaktionsansatzes (50 µl) auf das 0.8%ige Agarosegel aufgetragen. Spur 1: DNA-Marker; Spur 2: pSFV2β<sub>2</sub>ARHis10; Spur 3: Helper2.

#### Northern Blot-Analyse:

Durch die *Northern Blot*-Analyse wurde die Produktion der RNA bei der *in vitro* Transkription nachgewiesen. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis der *Northern Blot*-Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten β<sub>2</sub>AR cDNA-Sonde. Es sind zwei Banden zu erkennen. Die obere stärkere Bande ist DNA, die untere schwächere Bande zeigt die RNA. Die deutlich schwächere Intensität des RNA-Signals ist darauf zurückzuführen, daß die Hybridisierung zwischen RNA und DNA-Sonde durch die Sekundärstruktur der RNA erschwert wurde.

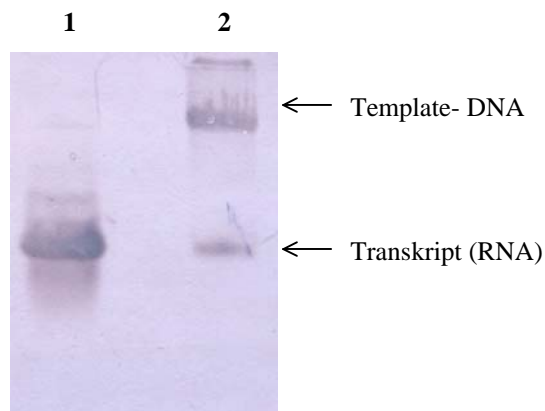


Abb. 3.5: *Northern Blot*-Analyse der RNA bei der *in vitro* Transkription. 3 µl des Transkriptionsansatzes wurden auf das 0,8%ige Agarosegel geladen. Spur 1: DNA-Fragment β<sub>2</sub>AR als positive Kontrolle. Spur 2: *in vitro* Transkriptionsansatz.

### 3.3 Produktion des humanen $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit dem *Semliki Forest* Virus- Expressionssystem

Für die Expression des human  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde der Vektor pSFV3 $\beta_2$ ARGFP als Kontrollplasmid verwendet. Bei Verwendung dieses Konstrukts wird das eGFP als C-terminaler Fusionspartner des Rezeptors produziert. Dies ermöglicht es, nach der Expression das Fluoreszenzsignal bei 488 nm im Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen (Abb. 3.6.A).

Die Fluoreszenz war wenige Stunden nach der Infektion sichtbar und war 40 Stunden nach der Infektion immer noch nachweisbar. Die *Western Blot*-Analyse mit dem anti-GFP-Antikörper zeigte auch, daß der Rezeptor mit GFP in den infizierten Zellen produziert wurde (Abb. 3.6.B). Eine Angabe zur Lokalisation des Rezeptors mit GFP in den infizierten Zellen war nicht möglich. Wie in der Abbildung 3.6.A veranschaulicht, beschränkte sich die GFP-Fluoreszenz nicht auf einen bestimmten Bereich der Zelle, sondern wurde in vielen Kompartimenten der Zelle beobachtet.

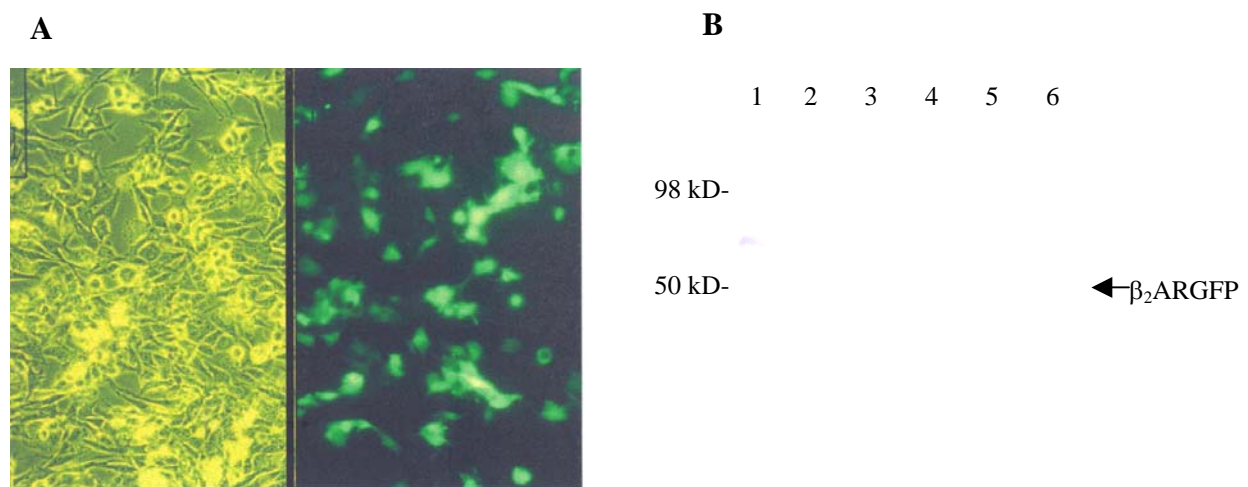


Abb. 3.6: A. Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation des rekombinanten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Fusion mit dem GFP in BHK-21-Zellen. Bild links: die Zellen unter dem Lichtmikroskop im Phasenkontrast. Bild rechts: die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm mit einem 510 nm-Filter. B. *Western Blot*-Analyse zur Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Fusion mit dem GFP in BHK-21-Zellen mit anti-GFP-Antikörper. Es wurden 10  $\mu$ g Membranen aufgetragen. Spur 1-5: Die Zellen wurden mit verschiedener MOIs mit  $\beta_2$ ARHis-GFP infiziert. Spur 6: nicht infizierte Zellen.

Für die anfängliche Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde der Vektor pSFV2 $\beta_2$ ARHis10 verwendet. Die Generierung rekombinanter SFV-Viren und ihre Aktivierung wurde wie unter Kap.2.8 beschrieben durchgeführt. Die adhärenenten BHK-21-

Zellen (90% konfluent) wurden mit einer MOI von 10 infiziert und nach 24 h geerntet. Die Infektion konnte durch Formveränderung der Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Der Nachweis der Produktion des rekombinanten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in SFV-infizierten Säugerzellen wurde durch die spezifische Bindung des radioaktiv markierten Antagonisten [5,7- $^3\text{H}$ ]-(-)-CGP-12177 oder [ $^3\text{H}$ ]-Dihydroalprenolol erbracht. Die Bindungstests wurden an Membranen und an ganzen Zellen durchgeführt. In BHK-21-Zellen, die mit dem Virus  $\beta_2\text{ARHis-SFV}$  infiziert wurden, konnten pro Zelle im Schnitt  $2,4 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$  spezifische Bindungsstellen für [ $^3\text{H}$ ]-Dihydroalprenolol nachgewiesen werden. Nach der Präparation von Membranen ergab der Bindungstest mit dem Antagonisten [5,7- $^3\text{H}$ ]-(-)-CGP-12177  $1,6 \pm 0,2$  pmol  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor pro mg Membranprotein. Im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten, wie z.B. 50 pmol/mg Membranprotein für den humanen Dopamin-Rezeptor (Lundstrom *et al.* 1998), 60 pmol/mg Membranprotein für 5HT $_3$ -Rezeptor aus Maus (Lundstrom *et al.* 1997) und 25 pmol/mg Membranprotein für den  $\alpha_{1B}$ -adrenergen Rezeptor (Scheer *et al.* 1999), ist die Menge des hier produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors sehr gering. Das SFV-Expressionssystem musste deshalb zunächst optimiert werden.

Das Ergebnis der *Western Blot*-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 15H6 (Agnes Szmolenszky, MPI für Biophysik) ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Dabei waren zwei schwache, einzelne Banden und eine Doppelbande auf der PVDF-Membran sichtbar. Bei der Bande um 23 kDa handelt es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt des Rezeptors, das durch Proteolyse entstanden ist. Bei der Bande bei 98 kDa handelt es sich möglicherweise um die dimere oder aggregierte Form des Rezeptors. Bei der Doppelbande um 46 kDa handelt es sich um den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor. Die Massendifferenz der Doppelbande beträgt etwa 1-3 kDa. Durch den Einsatz von Tunicamycin bzw. Swainsonin konnte das Bandenmuster nicht geändert werden.

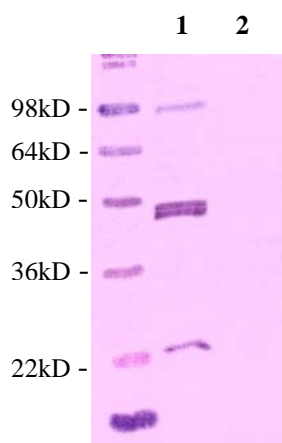


Abb. 3.7: *Western Blot*-Analyse zur Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen. Es wurden 10  $\mu\text{g}$  Membranen aufgetragen. Spur 1: mit  $\beta_2\text{ARHis-SFV}$  infizierte Zellen. Spur 2: mit pSFV2-SFV infizierte Zellen als negative Kontrolle.



## 3.4 Optimierung der heterologen Produktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen

### 3.4.1. Optimierung der *in vitro* Transkription

Eine erfolgreiche Virusproduktion ist von der Menge und Qualität der produzierten RNA abhängig. Folgende Faktoren sind für die RNA-Produktion bei *in vitro* Transkription von Bedeutung:

Die Qualität der Vektor-DNA: Da die lineare DNA höhere Ausbeuten an Transkripten ergibt und „*supercoiled*“ Plasmid-DNA überlange Transkripte erzeugt, sollte die Vektor-DNA linearisiert werden. Es wurde festgestellt, daß die DNA mit Restriktionsendonukleasen für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert werden musste, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Nach dem Restriktionsverdau sollte die DNA für die *in vitro* Transkription von Verunreinigungen befreit werden. Die vollständig verdaute DNA kann hierbei entweder durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung oder durch Gelfiltration über MicroSpin<sup>TM</sup> S-200 HR Säule gereinigt werden. Die gereinigte DNA von den beiden Methoden zeigte eine vergleichbare Reinheit. Dennoch war die Aufreinigung mittels MicroSpin<sup>TM</sup> S-200 HR Säule wesentlich schneller und wies eine höhere Rückgewinnungsrate auf. Diese Methode wurde für die weitere Arbeit verwendet.

Die Menge der Templat-DNA: In einem Bereich von 0,0025 µg bis 2,5 µg DNA pro 50 µl *in vitro* Transkriptionsansatz ist die RNA-Ausbeute proportional zur Menge der eingesetzten Vektor-DNA (Protokoll der Firma Epicentre, U.S.A.). In dieser Arbeit wurden verschiedene Mengen Vektor-DNA in einem 50 µl *in vitro* Transkriptionsansatz eingesetzt und die RNA-Produktion in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es zeigte sich, daß 1,25 µg DNA pro 50 µl Ansatz ausreichend waren, da bei weiterer Erhöhung der DNA-Menge die RNA-Produktion nicht gesteigert werden konnte. Dieser Wert deckt sich auch mit dem Protokoll von Kenneth Lundstrom und wurde für die weitere *in vitro* Transkription verwendet.

Das GTP/Cap-Analogon-Verhältnis: In Eukaryonten wird die mRNA am 5'-Ende durch Anhängen der Cap-Struktur modifiziert. Die Cap-Struktur schützt die mRNA gegen Abbau durch Nukleasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Translation. Deshalb ist es erforderlich, die bei der *in vitro* Transkription entstehenden RNA für die anschließende

Transfektion in die eukaryontischen Zellen mit einer Cap-Struktur zu versehen. Dies geschieht bei der *in vitro* Transkription durch die Zugabe des Cap-Analogons  $m^7G(5')ppp(5')G$ . Bei der Initiierung der Transkription wird das Cap-Analogon  $m^7G(5')ppp(5')G$  am 5'-Terminus anstelle von GTP durch die SP6-Polymerase eingebaut.

In der Praxis wurde die GTP-Konzentration im Reaktionsansatz auf 1/10 des üblichen Wertes (1 mM) reduziert und durch Zugabe des Cap-Analogons ersetzt (Krieg & Melton, 1987). Dabei wurde die größere Fraktion der produzierten RNA ge-„cappt“. Die gesamte Ausbeute blieb jedoch niedrig. Bei der Erhöhung der GTP-Konzentration konnte die Gesamtausbeute zwar erhöht werden, gleichzeitig aber sank der Wert an ge-„cappter“ RNA. Deshalb musste ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Cap-Analogon und GTP gefunden werden, um eine hohe Ausbeute an ge-„cappter“ RNA zu erzielen.

In dieser Arbeit wurden am Beispiel des Vektors pSFV2 $\beta_2$ ARHis10 verschiedene Cap-Analogon/GTP-Verhältnisse auf Transkriptionseffizienz getestet. Dabei wurden bei konstanter Konzentration des Cap-Analogons (1 mM) verschiedene Konzentrationen an GTP in den Transkriptionsansatz zugegeben und die entstandene RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese miteinander verglichen (Abb. 3.8). Bei Zugabe von 0,25 mM GTP ist in Spur 2 erkennbar, dass die gesamte RNA-Produktion deutlich höher ist als bei 0,1 mM GTP in Spur 1. Die GTP-Konzentration mit der höchsten RNA-Ausbeute lag bei 1 mM (Spur 4). Bei weiterer Zugabe von GTP ist der sichtbare Unterschied zwischen Spur 5 und 4 nicht ausgeprägt. Weiterhin ist erkennbar, dass die Qualität der RNA von Spur 2 nach Spur 4 abnimmt. Bei 0,25 mM GTP beträgt das Verhältnis Cap-Analogon/GTP 4:1. Dieser Wert deckte sich auch mit der Empfehlung der Firma Ambion (Cambridgeshire, U.K.). Deshalb wurden diese Cap-Analog- und GTP-Konzentrationen für die weitere Transkription verwendet.

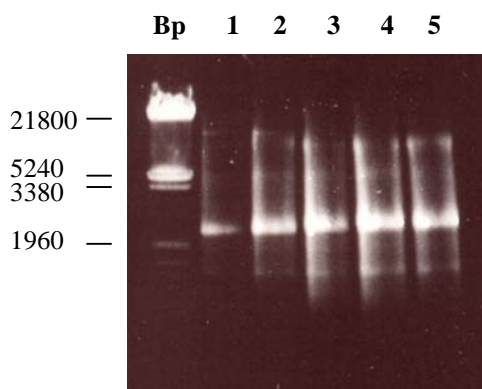


Abb. 3.8: Auswirkung verschiedener GTP-Konzentrationen bei der *in vitro* Transkription am Beispiel der synthetisierten  $\beta_2$ ARHis10-SFV-RNA. Es wurden je 1  $\mu$ L des Transkriptionsansatzes aufgetragen. Spur 1: 0,1 mM GTP; Spur 2: 0,25 mM GTP; Spur 3: 0,5 mM GTP; Spur 4: 1 mM GTP; Spur 5: 2 mM GTP.

Optimierung der Reaktion: Das Standard-Protokoll für die *in vitro* Transkriptionsreaktion kann modifiziert werden, um eine größere Ausbeute zu erlangen. Es wurde empfohlen, die Reaktionsdauer auf 4-6 Stunden zu verlängern (Protokoll der Firma Epicentre, U.S.A.). In dieser Arbeit wurde die Reaktionsdauer bei der Etablierung der *in vitro* Transkription in einem Bereich von 1-6 Stunden variiert. Es konnte festgestellt werden, dass eine optimale Reaktionsdauer bei 2 Stunden lag. Eine längere Reaktionsdauer erhöht die RNA-Produktion nicht. Allerdings war nach 2 Stunden Reaktionszeit ein verstärkter Abbau der produzierten RNA auf dem Agarosegel sichtbar. Eine andere Möglichkeit, die Ausbeute zu erhöhen, war die Reaktionstemperatur von 37°C auf 42°C zu erhöhen (Protokoll der Firma Epicentre, U.S.A.). In dieser Arbeit wurden *in vitro* Transkriptionsreaktionen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt und die RNA-Produktionen miteinander verglichen. Bei der Reaktion bei 37°C konnte die höchste Ausbeute erzielt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die *in vitro* Transkription in dieser Arbeit wie folgt durchgeführt:

- 1 µl SP6 RNA Polymerase zu dem Reaktionsansatz geben und 1 h bei 37 °C inkubieren.
- Danach zusätzlich 1 µl SP6 RNA Polymerase hinzugeben und weitere 1 h bei 37 °C inkubieren.

Qualität der Reaktionskomponenten: Die RNA-Produktion ist auch von der Qualität der einzelnen Reaktionskomponenten, insbesondere Enzym und Puffer, abhängig. In dieser Arbeit wurden drei SP6 RNA Polymerasen von den Firmen MBI Fermentas, New England Biolabs und Roche Diagnostics getestet und miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, daß die Polymerase der Firma Roche Diagnostics die besten Ergebnisse lieferte. Allerdings lagen die Ausbeuten der Polymerasen von den Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs nur geringfügig unter der der Firma Roche, so daß aus Kostengründen das Enzym der Firma MBI Fermentas gewählt wurde.

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten aus 1 µg Vektor-DNA durchschnittlich 10 µg RNA gewonnen werden. Weiterhin zeigte sich, daß die Ausbeute der Helper-RNA stets höher war als die der pSFV-RNA.

### **3.4.2 Optimierung der Virusproduktion mit Hilfe der Elektroporation**

Nach Optimierung der *in vitro* Transkription sollte die Optimierung der Ausbeute an infektiösen Viruspartikeln des SFV-Expressionssystems erfolgen. Lundström *et al.* (1999,

2001) haben gezeigt, dass ein Virustiter von  $10^9$  infektiösen Viruspartikeln pro mL mit dem SFV-Expressionssystem erreicht werden kann. Hierbei sollte untersucht werden, ob es möglich ist diesen hohen Virustiter zu erreichen. Für die Virusproduktion sind folgende Faktoren zu berücksichtigen:

Das Verhältnis zwischen RNA und Zellen: Der Expressionsvektor pSFV3 $\beta_2$ ARGFP wurde verwendet, um den Einfluss verschiedener Verhältnissen zwischen RNA und Zellen bei Elektroporation auf den Virustiter zu untersuchen. Die Produktion der  $\beta_2$ ARGFP- bzw. Helper2-RNA erfolgte nach der in Kap.2.8 beschriebenen Methode. Bei der Elektroporation wurden jeweils  $8 \times 10^6$  BHK-Zellen (90% konfluent) pro Ansatz verwendet. Die eingesetzte RNA-Menge wurde in einem Bereich von 4 bis 16  $\mu$ g pro Ansatz variiert. Nach dem Ernten der rekombinanten Viren wurden die Virustiter mit der Verdünnungsmethode („*End- Point Dilution*“) bestimmt. Die aus den verschiedenen Versuchen erhaltenen Virustiter befinden sich in Tabelle 3.1.

Es ist erkennbar, daß bei der Verdoppelung des RNA-Ansatzes von 4  $\mu$ g auf 8  $\mu$ g die Transformationseffizienz, die den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen zeigt, von 52% auf 81% ansteigt. Entsprechend ist eine deutliche Erhöhung des Virustiters dabei zu beobachten. Bei einem RNA-Ansatz von 12  $\mu$ g kann die höchste Transformationseffizienz und ein Virustiter von  $1,2 \times 10^9$  infektiöse Einheiten/ml erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der RNA-Menge auf 16  $\mu$ g führte jedoch zu einer Abnahme der Transformationseffizienz und damit zu einer Abnahme des Virustiters. Die Virusproduktion war offensichtlich von ausgewogenen Verhältnissen zwischen RNA und Zellen abhängig. Da bei 8  $\mu$ g eingesetzter RNA der Virustiter von  $10^9$  infektiöser Einheiten pro mL nahezu erreicht wurde und RNA-Produktion sehr kostspielig war, wurde diese Menge an RNA zu  $8 \times 10^6$  BHK-Zellen für die weitere Elektroporation zur Virusproduktion in dieser Arbeit eingesetzt. Diese RNA-Menge entspricht ungefähr der Ausbeute, die bei einem 50  $\mu$ l *in vitro* Transkriptionsansatz erzielt wird (siehe Kap. 3.4.1). Die Aufreinigung der Transkripte für die Elektroporation mit LiCl und EtOH ergab keine Steigerung des Virustiters. Aus diesem Grund wurden 50  $\mu$ l *in vitro* Transkriptionsansatz direkt für die Elektroporation eingesetzt.

Zellen/Ansatz	RNA/Ansatz	Transformations-Effizienz	Virustiter (infektiöse Einheiten/ml)
$8 \times 10^6$	4 µg	52 %	$3,5 \times 10^8$
$8 \times 10^6$	8 µg	81 %	$8,7 \times 10^8$
$8 \times 10^6$	12 µg	85 %	$1,2 \times 10^9$
$8 \times 10^6$	16 µg	57 %	$3,4 \times 10^8$

**Tabelle 3.1: Einfluss von verschiedener RNA/Zellen-Verhältnisse auf den Virustiter.** Virusproduktion erfolgte mittels Elektroporation von BHK-Zellen in PBS bei 25 µF und 1,5 kV. Die Viren wurden 24 h nach der Elektroporation geerntet. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchsreihen.

Elektroporationsmedium: Die Bestandteile des Elektroporationsmediums hat einen Einfluss auf die Effizienz der Elektroporation. Häufig werden die Zellen in gepufferten Salzlösungen, wie z.B. PBS-Lösung elektroporiert. Auch Kulturmedien ohne Zusatz von Serum finden häufig Verwendung. Um den Einfluss verschiedener Medien auf die Virusproduktion festzustellen, wurden die BHK-21-Zellen sowohl in PBS-Lösung als auch in DMEM-Medium, IMDM-Medium und ExCell293-Medium aufgenommen und elektroporiert. Für die Elektroporation in Kulturmedium mussten die BHK-Zellen zuerst in jeweiligem Medium adaptiert und nach der Elektroporation weiter in demselben Medium kultiviert werden. Das IMDM ist nach Angaben von DiCiommo *et al.* (1998) in seiner Zusammensetzung als Elektroporationsmedium sehr gut geeignet. Das ExCell293-Medium ist ein spezifisches Medium zur Kultivierung von HEK293-Zellen, welches als Elektroporationsmedium für BHK-Zellen einen sehr hohen Virustiter erzielen kann (Appel, 2003). Allerdings lieferten die Kulturmedien, bezogen auf die Virusaussbeute, kein besseres Ergebnis als die PBS-Lösung (Ergebnis nicht gezeigt). Der mögliche Grund dafür war, dass die hier durchgeführte Elektroporation unter Bedingungen erfolgte, welche lediglich für PBS optimiert waren. Um maximale Elektroporationseffizienzen zu erreichen, müssen alle Parameter für das jeweilige Medium optimal eingestellt werden. Da der Optimierungsprozess sehr zeit- und kostenaufwendig war und PBS gute Resultate ergab, wurde dieser Puffer als Standardbedingung für die Elektroporation verwendet.

Elektroporationsbedingung: Normalerweise hängt die Effizienz der Elektroporation von folgende Faktoren ab: Stärke des angelegten elektrischen Feldes, Dauer des elektrischen Impulses und Temperatur vor bzw. nach dem elektrischen Impuls. Nach umfangreichen

Vorversuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass hauptsächlich die Impulslänge eine entscheidende Rolle spielte. Ein kurzer elektrischer Impuls mit einer Zeitkonstante  $\tau < 1$  ms bedeutet eine schonende Elektroporation, welche die Zellen nicht sehr beeinträchtigt. Ein langer elektrischer Impuls mit einer Zeitkonstante bis zu  $\tau = 10$  ms ist sehr aggressiv für die Zellen, begünstigt jedoch den Gentransfer. Für eine optimale Virusproduktion sollten die meisten Zellen die Elektroporation überleben und gleichzeitig ein hoher prozentualer Anteil davon transformiert werden.

Wie in der Tabelle 3.2. dargestellt, können die meisten Zellen diese Behandlung überleben wenn die Zeitkonstante  $\tau$  zwischen 0,7 und 1,2 liegt, und die Effizienz des Gentransfers kann bis zu 80% betragen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Elektroporation weiterhin in zwei direkt aufeinander folgenden Pulsen bei 400 V und 25  $\mu$ F durchgeführt, wobei eine Zeitkonstante von 0,9 ms erzielt werden konnte. Der Widerstand wurde dabei auf unendlich eingestellt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine jeweils 5 minütige Inkubation der Zellen auf Eis vor und nach der Elektroporation zeigte keine eindeutige Verbesserung der Virusaussbeute (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zeitkonstante (ms)	Vitalität (%)	Transformations-Effizienz (%)
0,4	100	30
0,7	80	70
1,2	70	80
2,3	30	86
3,4	10	90
<b>Tabelle 3.2: Vergleich der elektrophysikalischen Elektroporationsbedingungen.</b> Die angegebenen Mittelwerte beziehen sich auf drei unabhängige Versuche.		

Erntezeitpunkt: In dieser Arbeit wurden die Viren durch einfaches Abgießen des Mediums gesammelt. Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt nach der Elektroporation sich die größte Menge an Viren gewinnen lässt, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten SFV- $\beta_2$ ARGFP Viren gesammelt und die Virustiter bestimmt.

Wie in der Tabelle 3.3 gezeigt, konnte bereits 16 h nach der Elektroporation ein Virustiter von  $2,3 \times 10^8$  infektiösen Viruspartikeln/ml erreicht werden. Der Virustiter stieg auf  $7,5 \times 10^8$  infektiöse Viruspartikeln/ml 24 h nach der Elektroporation. 30 h nach der Elektroporation war ein leichter Abfall des Virustiters im Vergleich zu 24 h zu erkennen. Danach nahm der

Virustiter stark ab. So zeigt sich deutlich, dass der optimale Erntezeitpunkt für rekombinante *Semliki Forest* Viren bei 24 Stunden nach der Elektroporation lag.

Erntezeitpunkt	16 h	20 h	24 h	30 h	40 h	50 h
<b>Virustiter</b> (infektiöse Einheiten/ml)	$2,3 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$6,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^4$

Tabelle 3.3: Einfluss des Erntezeitpunktes auf die Virusproduktion. Die SFV- $\beta_2$ ARGFP Viren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und anschließend die Virustiter bestimmt.

### 3.4.3 Einfluss N- und C-terminaler Fusionen auf die Produktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen

Hier sollte untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene N- und C-terminale Fusionen des Rezeptors auf die Rezeptorproduktion haben. Die Mengen an funktionellem Rezeptor sind für einzelne Rezeptorkonstrukte in der Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Die C-terminale Fusion des eGFP an den Rezeptor zeigte im Vergleich zum Basiskonstrukt  $\beta_2$ ARHis eine leicht höhere Ausbeute an Ligandenbindungsstellen.

Durch die Fusion von 10 Histidinresten am N-Terminus und die Biotinylierungsdomäne am C-Terminus zeigte das Konstrukt His $\beta_2$ ARBio im Vergleich zu  $\beta_2$ ARHis einen Rückgang der Ausbeute um 25%. Entsprechend wurde bei dem Konstrukt CAPHis $\beta_2$ ARBio im Vergleich zu CAP $\beta_2$ ARHis auch eine deutlich niedrigere Ausbeute ermittelt. Dabei wurde nicht weiter untersucht, ob dieser Rückgang an der Ausbeute in erster Linie an den unterschiedlichen Fusionen des Dekahistidin-Anhängsels lag.

Ein direkter Vergleich der beiden Konstrukte KHAFlag $\beta_2$ ARHis und  $\beta_2$ ARHis zeigte eine um 50% höhere Ausbeute an funktionellem Rezeptor für das Konstrukt mit der *Kozak*-Sequenz (K) und Hämagglutinin-Signalsequenz (HA).

Ein positiver Einfluss der *Enhancer*-Sequenz des Kapsid-Gens (CAP) aus dem Genom des *Semliki-Forest*-Virus auf die Rezeptorproduktion ließ sich durch direkten Vergleich der Ausbeuten der Konstrukte CAP $\beta_2$ ARHis mit  $\beta_2$ ARHis und CAPHis $\beta_2$ ARBio mit His $\beta_2$ ARBio ablesen. Die Konstrukte mit CAP-Sequenz zeigten um den Faktor 2 höhere Ausbeuten.

Der positive Effekt der CAP-Sequenz konnte durch die *Kozak*-Sequenz und Hämagglutinin-Signalsequenz nicht verstärkt werden. Das Konstrukt CAPKHAFlag $\beta_2$ ARHis, das die *Kozak*-,

HA-Signal- und CAP-Enhancer-Sequenz enthält, zeigte im Vergleich zu den Konstrukten KHAFlag $\beta_2$ ARHis und CAP $\beta_2$ ARHis deutlich niedrigere Ausbeuten.

Das beste Ergebnis, das hier erzielt wurde, lag bei  $3,4 \pm 0,4$  pmol  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor pro mg Membranprotein mit dem Konstrukt CAP $\beta_2$ ARHis.

Konstrukte	pmol Rezeptor / mg Membranprotein
$\beta_2$ ARGFP	$1,8 \pm 0,1$
$\beta_2$ ARHis	$1,6 \pm 0,2$
His $\beta_2$ ARBio	$1,2 \pm 0,3$
KHAFlag $\beta_2$ ARHis	$2,4 \pm 0,2$
CAP $\beta_2$ ARHis	$3,4 \pm 0,4$
CAPHis $\beta_2$ ARBio	$2,3 \pm 0,2$
CAPKHAFlag $\beta_2$ ARHis	$1,9 \pm 0,3$
<b>Tab.3.4: Vergleich der Ausbeuten unterschiedlicher Rezeptorkonstrukte.</b> BHK-Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und nach 24 h geerntet. Die Ligandenbindungsstellen wurden an der Membran mit [ $^3$ H]CGP-12177 gemessen.	

### 3.4.4 Einfluss der Infektionsmultiplizität auf die Ausbeute des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

Als nächster Schritt wurde der Einfluss der Infektionsmultiplizität (*Multiplicity of Infection*, MOI) auf die Ausbeute untersucht. Dazu wurden BHK-21-Zellen mit dem rekombinanten Virus SFV- $\beta_2$ ARGFP mit unterschiedlicher MOI infiziert. Die Infektion wurde Fluoreszenzmikroskopisch verfolgt und die Transfektionseffizienz wurde bestimmt. Nach 24 Stunden wurden Membranen präpariert und Ligandenbindungstests mit [ $^3$ H]CGP-12177 durchgeführt. Ab einer MOI von 10 wurde bereits eine Transfektionseffizienz von 100% erreicht (Ergebnis nicht gezeigt). Dagegen zeigte die Menge an funktionellem Rezeptor einen Anstieg mit zunehmender MOI (Abb. 3.9.A). Bei einer Erhöhung der MOI von 10 auf 50 war eine Steigerung der Ausbeute um den Faktor 4,7 auf  $8,5$  pmol Rezeptor pro mg Membranprotein zu beobachten. Ab einer MOI von 50 verlangsamte sich der Anstieg. Bei einer MOI von 100 konnte eine fünffach höhere Ausbeute von bis zu  $10,8$  pmol Rezeptor pro mg Membranprotein im Vergleich zu der bei MOI von 10 nachgewiesen werden.

Ähnliche Experimente wurden mit den rekombinanten Viren SFV- $\beta_2$ ARHis, SFV-CAPHis $\beta_2$ ARBio und SFV-CAP $\beta_2$ ARHis durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10.B-D dargestellt. Mit SFV-CAPHis $\beta_2$ ARBio konnte ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Die



Ausbeute stieg mit der Infektionsmultiplizität, um bei einer MOI von 66 abzuflachen. Dagegen stieg die Ausbeute bei SFV- $\beta_2$ ARHis direkt proportional mit der MOI in einem Bereich von 10 bis 100, ohne abzuflachen. Bei einer MOI von 100 konnte eine Ausbeute von 8,4 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erreicht werden. Im Vergleich zu der Ausbeute bei einer MOI von 10 entspricht dies einer Erhöhung um den Faktor 6,5. Bei dem Konstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis nahm die Ausbeute proportional zu der MOI in einem Bereich von 10 bis 200 zu. Bei einer MOI von 200 konnten 16 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein gemessen werden.

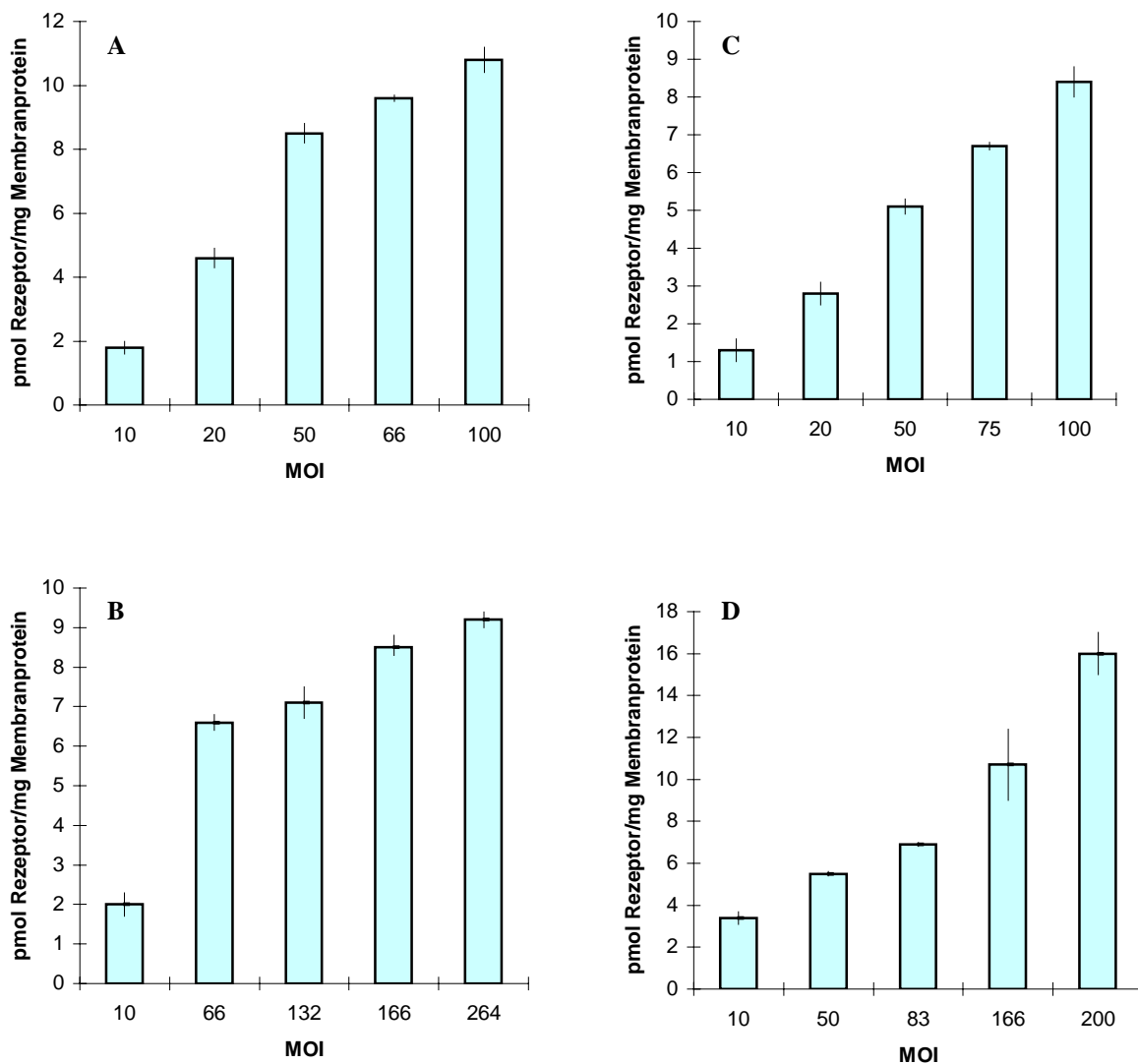


Abb. 3.9 Einfluss der Infektionsmultiplizität auf die Ausbeute. A:  $\beta_2$ ARGFP; B: CAPHis $\beta_2$ ARBio; C:  $\beta_2$ ARHis; D: CAP $\beta_2$ ARHis.

### 3.4.5 Zeitlicher Verlauf der Rezeptorproduktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in verschiedenen Zelllinien

Die Zelllinien BHK-21, CHO-K1, COS7 und HEK293 werden am häufigsten für die heterologe Expression von GPCRs mittels SFV-Expressionssystem verwendet (Lundstrom, 2003). Bei der Expression bestimmter Rezeptorkonstrukte in verschiedenen Zelllinien wurden oft unterschiedliche Mengen an Rezeptor erhalten, die auch vom Erntezeitpunkt abhängig sind (Lundstrom *et al.*, 2001). Hier wurden die vier genannten Zelllinien auf die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors untersucht. Dazu wurden die Zellen in 145 cm<sup>2</sup> Schalen mit dem rekombinanten Virus SFV-CAP $\beta_2$ ARHis mit einer MOI von 50 infiziert. Nach 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42 und 48 Stunden wurden die Zellen durch Abschaben von der Zellkulturschale geerntet und das Zellsediment anschließend bei –20°C gelagert. Die Membranpräparation und der Ligandenbindungstest wurde wie unter 2.6.1 und 2.8.6 beschrieben durchgeführt.

In allen Zellen konnte 12 Stunden nach der Infektion Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Wie in der Abb. 3.10.A gezeigt, erreichte die Rezeptorproduktion in BHK-21-Zellen ein Maximum 20 Stunden nach der Infektion. Danach fiel die Rezeptorproduktion wieder ab. Der zeitliche Verlauf der Rezeptorproduktion bei den HEK-293-Zellen war ähnlich, allerdings zeitlich leicht nach vorne versetzt. Bereits 16 Stunden nach der Infektion war ein Maximum zu erkennen und danach ging die Expression stark zurück. Im Gegensatz dazu ergab der zeitliche Verlauf der Rezeptorproduktion in CHO-K1-Zellen, daß der Rezeptor erst 36 Stunden nach der Infektion am stärksten produziert wurde. Mit einem ähnlichen Verlauf stieg die Rezeptorproduktion in den COS7-Zellen sehr langsam an und erreichte 42 Stunden nach der Infektion das Maximum.

Die immunologische Analyse mit infizierten BHK-21-Zellen zeigte für den zeitlichen Verlauf der Rezeptorproduktion Ergebnisse, welche nicht mit denen des Bindungstests übereinstimmten. Der *Western Blot*-Analyse zufolge wurde der Rezeptor erst 28 Stunden nach der Infektion in BHK-21-Zellen in höchstem Ausmaß produziert (Abb. 3.10.B). Allerdings ist dabei nur ein Teil der gesamten Rezeptorpopulation funktionell. Für die nachfolgende Reinigung des rekombinanten Rezeptors sind nur diese funktionellen Rezeptorproteine von Bedeutung, die nur bei Ligandenbindungstests erfasst werden. Deshalb erfolgte die Ernte der Rezeptorproduktion in BHK-21-Zellen, wie bei den Bindungstests ermittelt wurde, 20 Stunden nach der Infektion.

Vergleicht man das höchste Expressionslevel in den vier Zelllinien, so stellt man fest, daß die Produktion in HEK293-Zellen mit 2,6 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein am niedrigsten

war. Eine höhere Rezeptorproduktion wiesen die COS7-Zellen mit 4,5 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein auf. Die BHK-21-Zellen produzierten mit 5,6 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein doppelt so viel wie die HEK293-Zellen. Die Produktion war in CHO-K1 Zellen mit 7,0 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein am höchsten.

Die *Western Blot*-Analyse der Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in den vier genannten Zelllinien wurde in Abb. 3.10.C gezeigt.

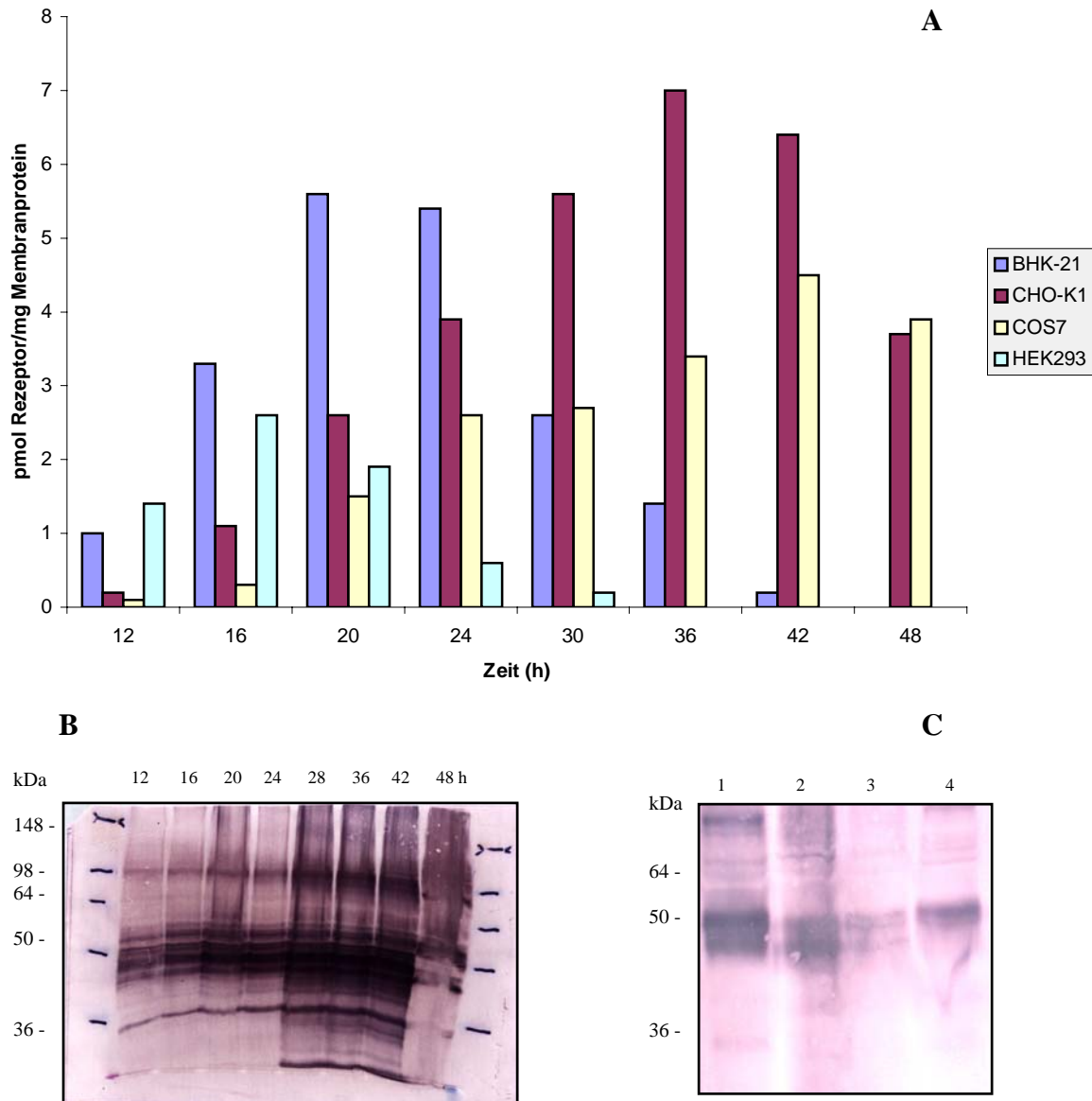


Abb. 3.10: A. Zeitlicher Verlauf der Rezeptorproduktion in verschiedenen Zelllinien. Die Ligandenbindungsstellen wurden mit  $[^3\text{H}]\text{CGP-12177}$  gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen. B. Immunologische Analyse einer Zeitreihe SFV-CAP- $\beta_2\text{ARHis}$  infizierter BHK-21-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 15H6. Pro Spur wurde 10  $\mu\text{g}$  Membran aufgetragen. C. *Western Blot*-Analyse des zeitlichen Verlaufs der Rezeptorproduktion in verschiedenen Zelllinien. 1: CHO-K1; 2: BHK-21; 3: HEK293; 4: COS7.

### 3.4.6 Einfluss der Zugabe von Liganden ins Medium auf die Rezeptorproduktion

Ein positiver Einfluss von Liganden im Induktionsmedium wurde bereits für die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in *Saccharomyces cerevisiae* (King *et al.*, 1990) und in *Pichia pastoris* (Weiß, 1998) beschrieben. Durch Zugabe des Antagonisten Alprenolol in das Expressionsmedium konnten deutlich mehr Ligandenbindungsstellen für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor gemessen werden (Weiß, 1998; Reinhart, 2000). In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von Liganden im Medium auf die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen mit dem SFV-Expressionssystem untersucht. In Abb. 3.11.A ist deutlich zu sehen, dass die Zugabe von 2-5  $\mu$ M Alprenolol ins Medium sich zur Produktionssteigerung eignete. Eine weitere Erhöhung der Alprenolol-Konzentration im Medium brachte keine weitere Steigerung, sondern führte zu einem Abfall der Rezeptorproduktion. In den mit dem Viruskonstrukt SFV- $\beta_2$ ARHis infizierten Zellen konnte die Ausbeute an bindungsfähigem Rezeptor durch eine Zugabe von 5  $\mu$ M Alprenolol um einen Faktor 2,1 erhöht werden. In den mit dem Viruskonstrukt SFV-KHA $\beta_2$ ARHis infizierten Zellen lag die maximale Produktionssteigerung um einen Faktor von 2,6 bei 2  $\mu$ M Alprenolol. Dieser positive Einfluss war am meisten ausgeprägt bei dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis. Eine Zugabe von 2  $\mu$ M Alprenolol im Medium brachte eine Steigerung der Rezeptorexpression um einen Faktor von 3,7 (von 2,3 auf 8,4 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein).

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob der positive Einfluss der Liganden-Zugabe auf die Rezeptorproduktion durch Infektionsmultipilzität verstärkt werden konnte (Abb. 3.11.A). Es stellte sich heraus, daß die Ausbeuten bei verschiedenen Alprenolol-konzentrationen im Medium mit zunehmender MOI weiter gesteigert werden konnte. Bei einer MOI von 150 und 2  $\mu$ M Alprenolol im Medium konnten 49,6 pmol  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor pro mg Membranprotein gemessen werden.

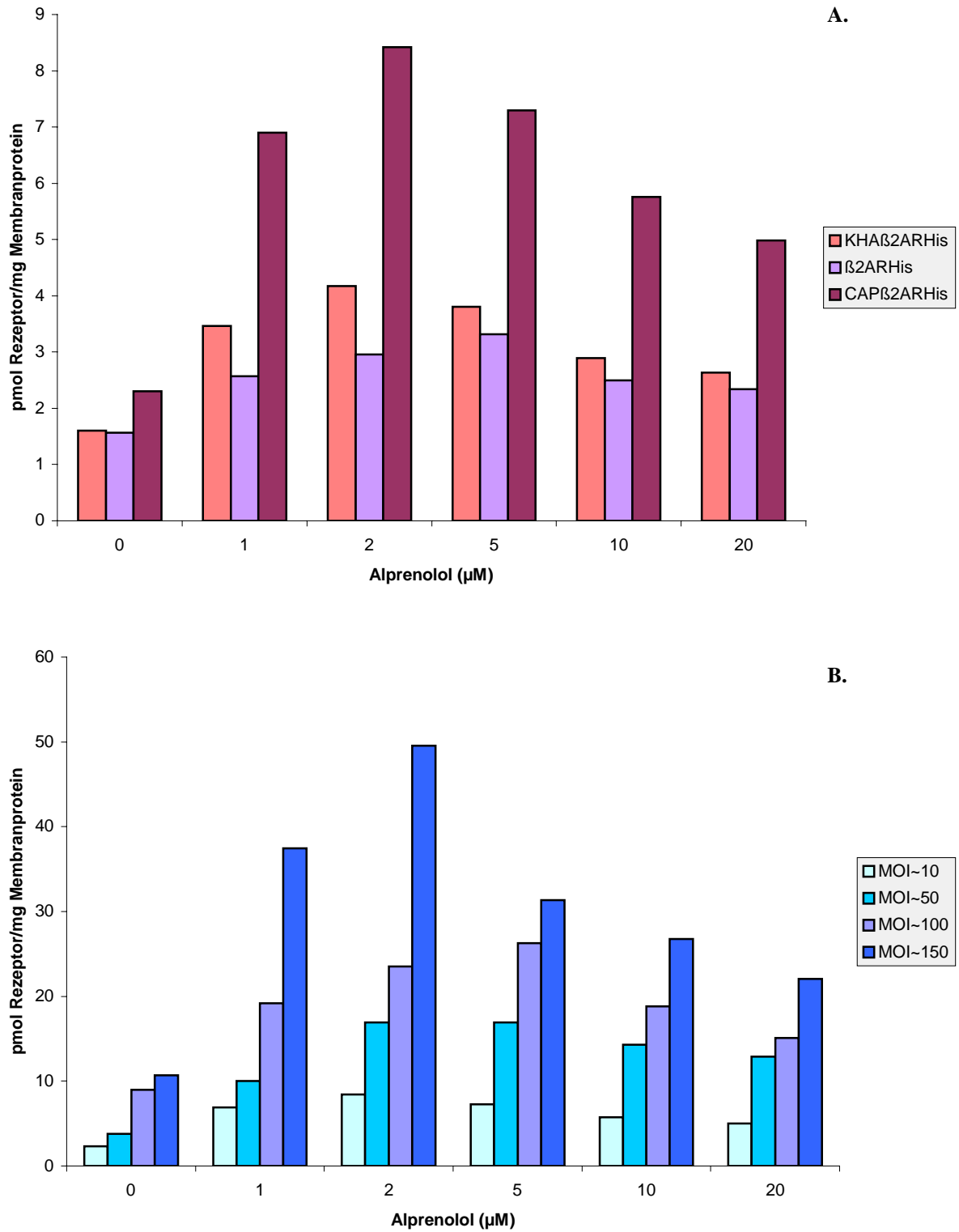


Abb. 3.11: A. Produktionssteigerung in BHK-21-Zellen nach Zugabe des Liganden Alprenolol in das Medium. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Die Ligandenbindungsstellen wurden an der Membran mit [<sup>3</sup>H]CGP-12177 gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen. B. Einfluss des Liganden und der Infektionsmultiplizität auf die Ausbeute. Die BHK-21-Zellen wurden mit SFV-CAPβ<sub>2</sub>ARHis infiziert.

### 3.4.7 Effekt der extrazellulären $K^+$ -Konzentration auf die rekombinante Proteinproduktion

Die Infektion von Säugerzellen mit *Sindbis* Virus, ein ähnliches Alphavirus wie das *Semliki Forest* Virus, hat eine Inhibition der membranassoziierten  $Na^+/K^+$ -ATPase zur Folge (Garry, 1994). Hier zeigte sich, dass nach Infektion die intrazelluläre Kalium-Konzentration auf ein niedriges Niveau sank und infolgedessen die Proteinsynthese in der Wirtszelle stark reduziert wurde. Durch eine Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration im Medium nach der Infektion konnte diese Virus-induzierte Termination der zellulären Proteinsynthese teilweise aufgehoben werden. Die Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration im Medium hat auch einen positiver Einfluss auf die rekombinante Proteinproduktion (Ciccarone *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde der Effekt der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration auf die Produktionsrate des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors im SFV-Expressionssystem untersucht. Dazu wurden BHK-21-Zellen mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis mit einer MOI von 10 infiziert und anschließend in Medien mit verschiedenen  $K^+$ -Konzentrationen inkubiert. Nach 20 Stunden wurden die Zellen geerntet. Membranpräparation und Ligandenbindungstest wurden wie unter 2.6.1 und 2.8.6 beschrieben durchgeführt.

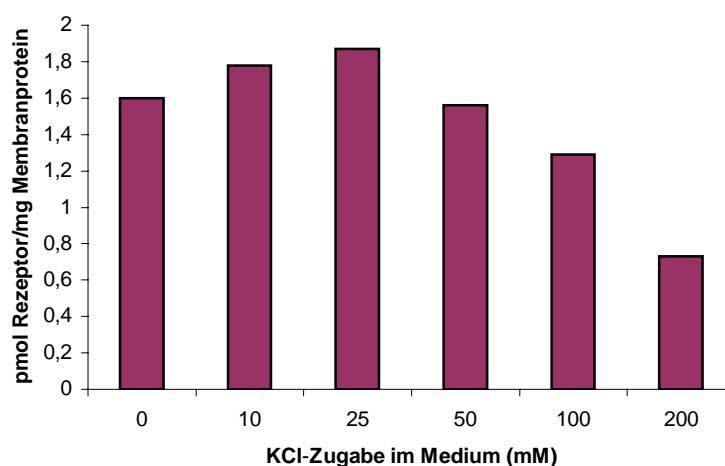


Abb. 3.12: Einfluss der  $K^+$ -Konzentration auf die Rezeptorproduktion.

Das Ergebnis in Abbildung 3.12 zeigt, dass durch Zugabe von KCl ins Medium die Rezeptorproduktion nur leicht erhöht werden konnte. Bei 25 mM KCl im Medium war die Ausbeute um 17% höher als ohne KCl. Eine weitere Erhöhung der KCl-Konzentration führte zu einem Abfall der Ausbeute. Ab Konzentrationen von 100 mM wirkte KCl cytotoxisch und führte zum Zelltod. Die in der Literatur angegebene 2- bis 4-fach Erhöhung der

rekombinanten Proteinexpression bei 100 mM KCl konnte hier nicht bestätigt werden. Bei einer Infektion der BHK-21-Zellen mit SFV-CAP $\beta_2$ His mit einer MOI von 50 hatte die Zugabe von KCl ins Medium sogar negativen Einfluss auf die Rezeptorproduktion (Ergebnis nicht gezeigt). So lässt sich vermuten, daß der positive Effekt von KCl auf die rekombinante Proteinexpression nur bei Infektionen mit niedrigen MOIs eintritt.

### **3.4.8 Einfluss der Infektionsmedien auf die Rezeptorproduktion**

Fötale Kälberserum (FKS), das am häufigsten verwendete Supplement des Zellkulturmediums, enthält Hormone und Wachstumsfaktoren, die die Zellen zum Wachsen und Leben brauchen. Für die Infektion wird in vielen Protokollen ein FKS-freies Medium vorgeschlagen, da die Viruspartikel angeblich durch Serumproteine abgefangen werden. Auch PBS-Puffer wird in einigen Fällen als Infektionsmedium verwendet. Hier sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Zusammensetzung des Infektionsmediums auf die Infektion mit dem rekombinanten Virus hat. Dazu wurden BHK-21-Zellen mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ His mit einer MOI von 66 infiziert. Die Infektion wurde sowohl in PBS-Puffer, als auch in Zellkulturmedium mit und ohne FKS durchgeführt. Nach 1,5 Stunden wurde das Infektionsmedium durch frisches Medium ersetzt. Um den Einfluss des Mediums während der Infektion zu verdeutlichen, wurden verschiedene Alprenolol-Konzentrationen im Medium eingesetzt. Nach 20 Stunden wurden Membranen präpariert und Ligandenbindungstests mit [ $^3$ H]CGP-12177 durchgeführt.

Wie Abbildung 3.13 illustriert, bewirkte die Verwendung von FKS-freiem Medium während der Infektion im Vergleich zu FKS-haltigem Medium nur eine geringe Verbesserung der Produktionsrate. Ein Abfangen des Viruspartikels durch Serumproteine konnte in diesem Fall nicht beobachtet werden. Im Gegenteil zeigte die Infektion in PBS-Puffer bei allen getesteten Alprenolol-Konzentrationen deutlich höhere Ausbeute. Deshalb wurden in weiteren Experimenten Infektionen in PBS-Puffer durchgeführt.

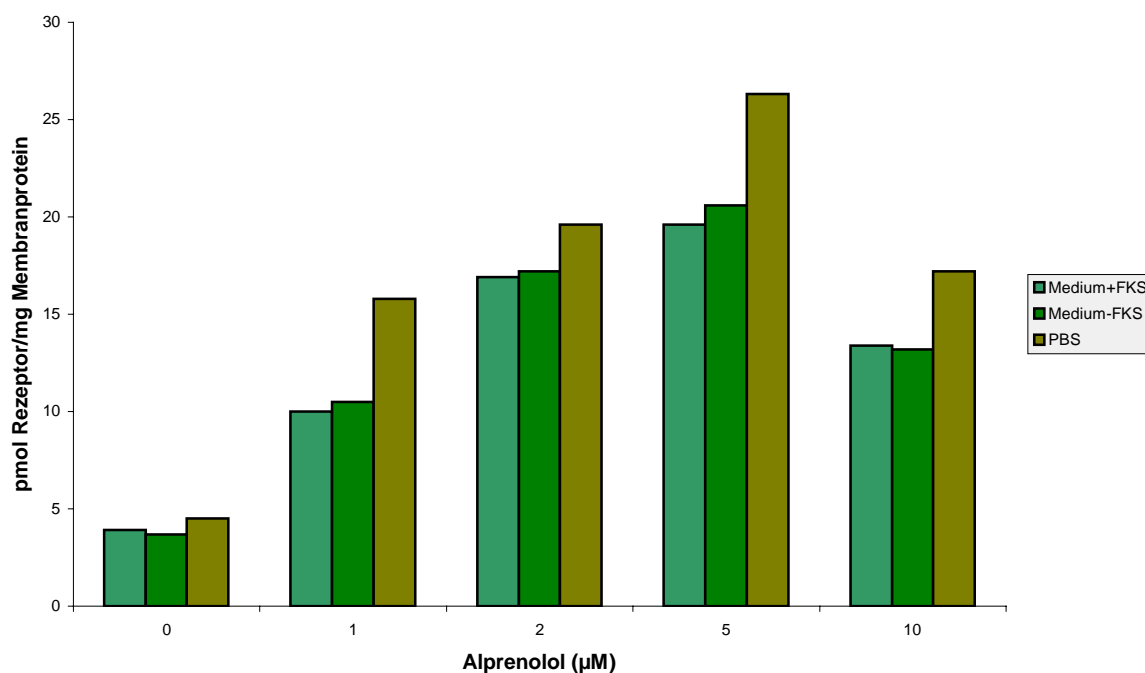


Abb. 3.13 Einfluss der Infektionsmedien auf die Rezeptorproduktion. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

### 3.4.9 Einfluss von DMSO und Inhibition der Proteinkinase C auf die Rezeptorproduktion in BHK-21-Zellen

Für den Histamin  $H_1$ -Rezeptor konnte eine Steigerung der Rezeptorproduktion in *Pichia pastoris* durch Inhibition der Proteinkinase C mit Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) oder Staurosporin erzielt werden (Ivanovic, 2001). Auch die Zugabe von DMSO bewirkte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Menge an aktivem Rezeptor, obwohl der Effekt von DMSO schwer einzuordnen war. DMSO hat je nach Zellarten verschiedene Effekte auf Zellwachstum und -differenzierung. Im Kulturmedium dient DMSO auch als zusätzliche Kohlenstoffquelle. Außerdem gehört DMSO, wie Glycerin und TMSO, zu chemischen Chaperonen, die die native Konformation der Proteine stabilisieren können. Die neueste Untersuchung zeigt, dass chemische Chaperone auch die *in vivo* Faltung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren begünstigen können (Bernier *et al.* 2004). Durch Zugabe von Glycerin ins Wachstumsmedium konnte der Expressionslevel des rekombinanten Proteins sowohl in Hefe als auch in einem prokaryotischen Expressionssystem deutlich gesteigert werden (Figler, *et al.*, 2000; Leandro, *et al.*, 2001).

Die Wirkung von diesen Substanzen auf die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen wurde in dieser Arbeit untersucht. Es stellte sich heraus, daß DMSO eine starke



Steigerung der Rezeptorproduktion bewirkte (Abb. 3.14.A). Wurden Membranen aus den Zellen präpariert, die im Kulturmedium mit 2 % DMSO inkubiert wurden, konnten diese im Vergleich zur Kontrollmembran 130% mehr spezifische [ $^3$ H]CGP-12177-Bindungsstellen aufweisen. Eine Erhöhung der DMSO-Konzentration im Medium über 2% führte wegen des zyotoxischen Effekts auf die Zellen zu einem Abfall der Rezeptorproduktion (Ergebnis nicht gezeigt). Die Inhibition der Proteinkinase C durch PMA oder Staurosporin brachte nur eine geringfügige Verbesserung der Rezeptorproduktion. Mit 40  $\mu$ M PMA konnte eine Produktionssteigerung von 45% erzielt werden (Abb. 3.14.B). Das beste Ergebnis für Staurosporin lag bei einer Konzentration von 50 nM und die Produktionssteigerung betrug dabei 33% (Abb. 3.14.C).

In Kapitel 3.4.6 wurde bereits gezeigt, daß durch Zugabe von Liganden ins Kulturmedium die Rezeptorproduktion stark gesteigert werden konnte. Hierbei sollte untersucht werden, ob der positive Einfluss von Liganden durch DMSO verstärkt werden konnte. Die Abbildung 3.15.D zeigte, daß die Ausbeute von 24,7 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein bei einer Alprenolol-Konzentration von 5  $\mu$ M durch DMSO nur leicht übertroffen werden. Lediglich eine Zunahme von 6,5% wurde bei 1% DMSO beobachtet.

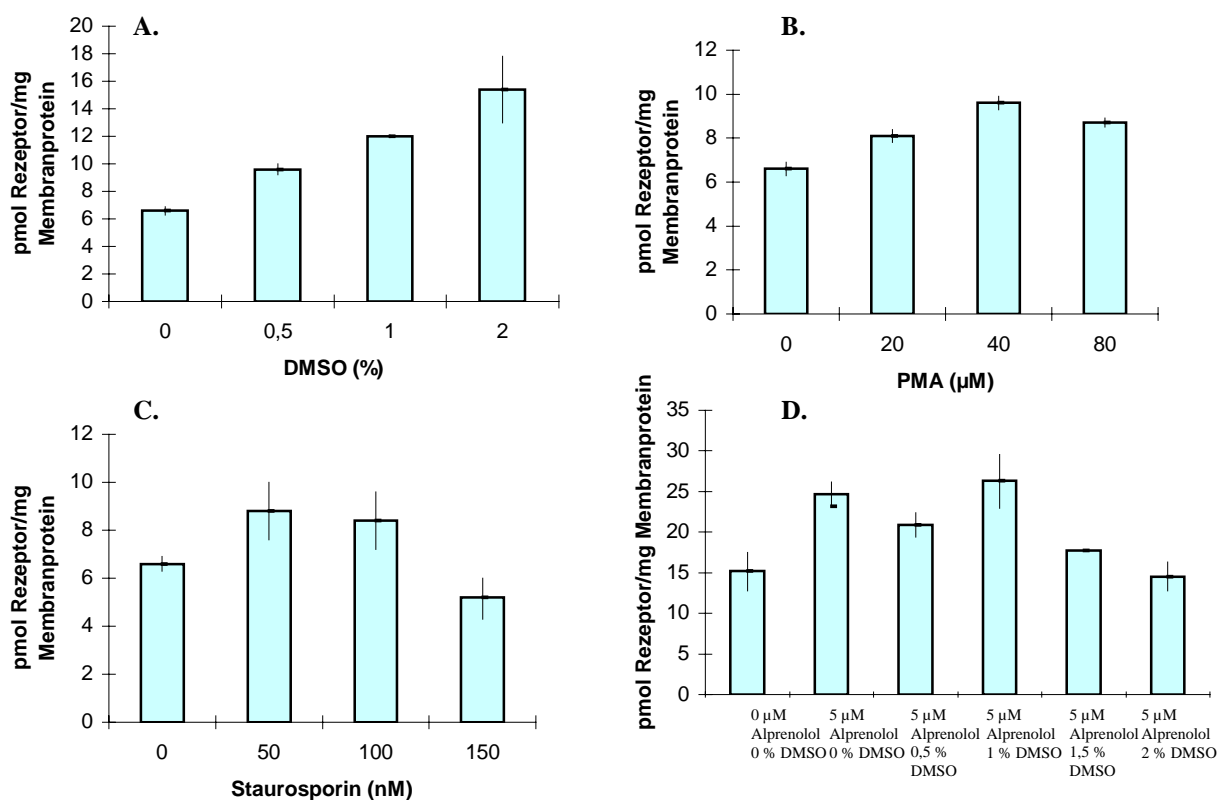


Abb.3.14: Einfluss von DMSO und Inhibition der Proteinkinase C durch PMA oder Staurosporin auf die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in mit SFVCAP $\beta_2$ ARHis infizierten BHK-21-Zellen (MOI~66). Die Ligandenbindungsstellen wurden an der Membran mit [ $^3$ H]CGP-12177 gemessen.

### 3.5 Charakterisierung des heterolog produzierten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

#### 3.5.1 Lokalisation des rekombinanten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des heterolog produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde eine Immunogoldmarkierung mit anschließender Elektronenmikroskopie freundlicherweise von Herrn Dr. W. Haase und Frau F. Joos (MPI für Biophysik, Frankfurt a.M.) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 zusammengefasst.

Die Immunogoldmarkierung erfolgte zunächst in einem *post-embedding*-Verfahren. Bei diesem Verfahren wird die vorher fixierte Probe in Kunstharz eingebettet, geschnitten und dann mit den Antikörpern inkubiert, sodass alle Epitope, sowohl in der Zelle als auch an der Cytoplasmamembran, nachweisbar sind. Sowohl bei den nicht infizierten Zellen als auch bei der Kontrolle (nur mit dem Viruskonstrukt SFV2gen infizierte Zellen) war keine Markierung sichtbar (Abb. 3.15.A und B). Unter der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 15H6 war die Immunogoldmarkierung in den mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis infizierten BHK-21-Zellen hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum zu erkennen (Abb. 3.15.C). In den mit dem Viruskonstrukt SFV-KHAFlag $\beta_2$ ARHis infizierten BHK-21-Zellen zeigte die Immunogoldmarkierung eine ähnliche Verteilung (Abb. 3.15.E).

Die HEK-293-Zellen wurden auch mit den Viruskonstrukten SFV-CAP $\beta_2$ ARHis und SFV-KHAFlag $\beta_2$ ARHis infiziert und mit dem Immunogold-markierten monoklonalen Antikörpers 15H6 behandelt. Die Markierung zeigte ebenfalls eine bevorzugte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3.15.D und F).

Die Immunogoldmarkierung wurde auch in einem *pre-embedding*-Verfahren durchgeführt, bei dem die Probe vor der Einbettung in Kunstharz mit Antikörpern markiert wurde. Im Gegensatz zum *post-embedding*-Verfahren waren somit nur Epitope auf der Zelloberfläche für den Antikörper zugänglich. Die Zellen wurden mit dem Viruskonstrukt SFV-KHAFlag $\beta_2$ ARHis infiziert und die Markierung erfolgte unter der Verwendung des Anti-Flag-M2-Antikörpers. Der Anti-Flag-M2-Antikörper erkennt das am N-Terminus des Rezeptors fusionierte Flag-Epitop, das bei korrekter Insertion des Rezeptors in die Cytoplasmamembran extrazellulär lokalisiert sein sollte. Allerdings zeigten die Proben unter dem Elektronenmikroskop keine eindeutige Markierung (Ergebnis nicht gezeigt).

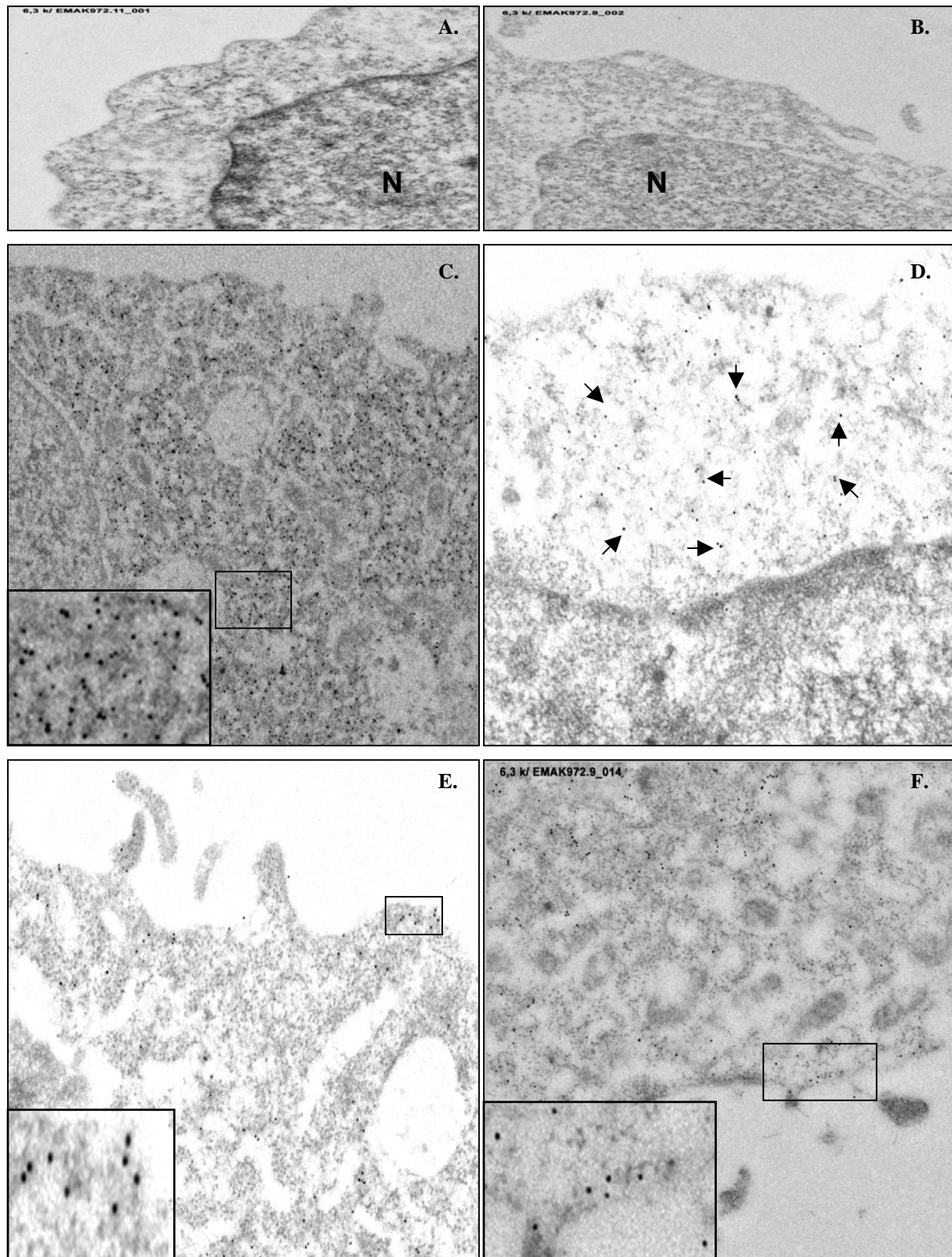


Abb.3.15: Elektronenmikroskopische Lokalisierung des rekombinanten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen. (A): BHK-21-Kontrollzellen. Die BHK-21-Zellen wurden entweder mit dem rekombinanten Virus SFV-CAP $\beta_2$ ARHis (C) und SFV-KHAFlag $\beta_2$ ARHis (E) infiziert. Die HEK-293-Zellen wurden entweder nicht infiziert (B) oder mit dem rekombinanten Virus SFV-CAP $\beta_2$ ARHis (D) und SFV-KHAFlag $\beta_2$ ARHis (F) infiziert. Mit dem monoklonalen Antikörper 15H6 wurde die Immunogoldmarkierung nach dem *post-embedding*-Verfahren durchgeführt.

### 3.5.2 Glykosylierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen

Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors besitzt 2 mögliche N-Glykosylierungsstellen. Eine befindet sich im N-terminalen Abschnitt, die andere in der zweiten extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die mögliche N-Glykosylierung wurde zunächst mit Hilfe der Inhibitoren Tunicamycin und Swainsonin untersucht. Tunicamycin, ein von *Streptomyces lysosuperificus* synthetisiertes Nukleosid-Antibiotikum, hemmt den ersten Syntheseschritt der N-Glykosylierung. Swainsonin, als erste Glykosidasehemmstoffe aus *Swainsona canescens* isoliert, hemmt die lysosomale  $\alpha$ -Mannosidase und Golgi  $\alpha$ -Mannosidase II und blockiert die Bildung von Glykanen vom komplexen Typ.

Die mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis infizierten BHK-21-Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von Tunicamycin bzw. Swainsonin kultiviert. 20 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt. Auf dem *Western Blot* zeigt sich in allen Spuren eine 49 kDa Bande (Abb. 3.16). Bei den Kontrollzellen sind auch Banden zwischen 52 und 57 kDa zu erkennen. Diese Banden verschwinden bei den mit Tunicamycin behandelten Zellen, wobei gleichzeitig die 49 kDa-Bande intensiver wird. Die Banden zwischen 52 und 57 kDa repräsentieren vermutlich die möglichen Glykosylierungszustände des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors und die 49 kDa große Bande markiert möglicherweise den unglykosylierten Rezeptor. Durch den Einsatz von Swainsonin wurde das Bandenmuster nicht geändert. Daraus lässt sich schließen, daß die N-Glykane des in BHK-21-Zellen produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors nicht zu dem komplexen Typ gehört. Diese Annahme wurde durch Analysen mit Endoglykosidase H (Endo H) bestätigt. Dieses Enzym ist in der Lage, spezifisch nur die N-glykosidischen Oligosaccharide vom Mannosereichen Typ zu spalten. Aus Abb. 3.16 wird ersichtlich, daß durch Endo H-Verdau die Banden zwischen 52 und 57 kDa, ähnlich wie bei der Tunicamycin-Behandlung, verschwinden. Damit ist gezeigt, daß der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor in BHK-21-Zellen glykosyliert wird und die Glykosylierung zum hochmannosidischen Typ gehört.

In dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob die Anwesenheit von Tunicamycin im Kulturmedium einen Einfluss auf die Rezeptorproduktion hat. Dazu wurden nach der Infektion verschiedene Tunicamycin-Konzentrationen ins Kulturmedium gegeben und nach 20 Stunden Membranen präpariert. Die Ausbeuten wurden durch Ligandenbindungstests mit [ $^3$ H]CGP-12177 ermittelt und miteinander verglichen. Das Ergebnis in Abb. 3.17 zeigt, daß Tunicamycin nur einen leichten konzentrationsabhängigen Effekt auf die Ausbeute hat. Die

Western Blot-Analyse liefert das gleiche Ergebnis. Hier zeigte sich, daß sich die Intensität der 49 kDa-Bande bei zunehmender Tunicamycin-Konzentration kaum ändert.

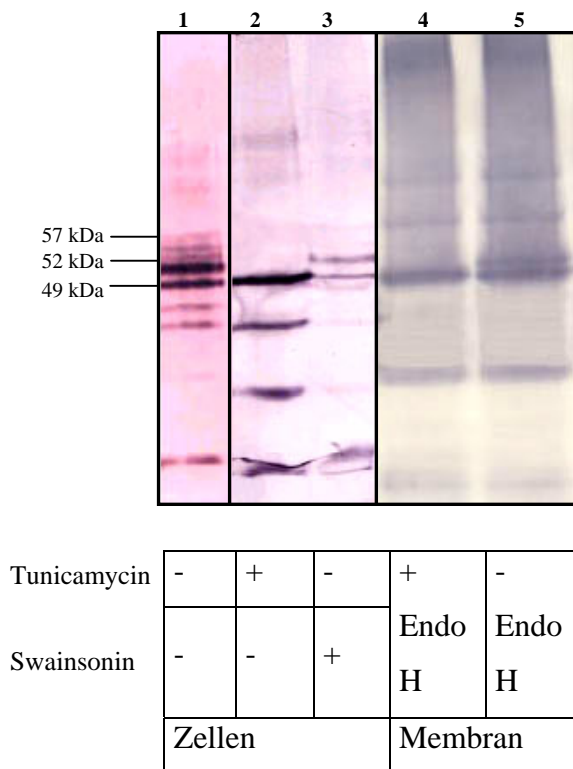


Abb.3.16: Immunologische Analyse der Glykosylierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper 15H6. Spur 1-3: Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Nach der Infektion wurde Tunicamycin (Spur 2) oder Swainsonin (Spur 3) mit einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  zu den Kulturen gegeben. 20 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und direkt in Lysis-Puffer lysiert. Pro Spur wurde Lysat von 100000 Zellen aufgetragen. Spur 4: Membranen mit Endo H-Behandlung. Spur 5: Membranen ohne Endo H-Behandlung.

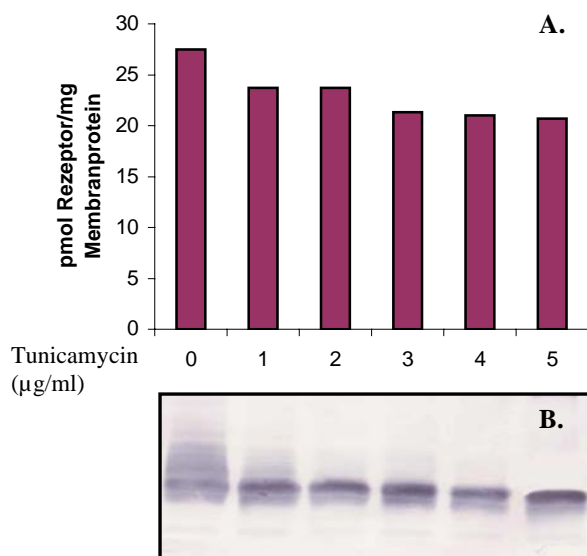


Abb.3.17: Einfluss von Tunicamycin auf die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen. A: Ligandenbindungstest mit [ $^3\text{H}$ ]CGP-12177. B: Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 15H6.

### 3.5.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  des Antagonisten [ $^3\text{H}$ ]CGP-12177 an Membranen von den mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis infizierten Zellen wurden

Sättigungskurven aufgenommen. Da der Antagonist Alprenolol zur Produktionserhöhung als Zusatz im Kulturmedium verwendet wurde, sollte hier untersucht werden, ob die Anwesenheit von Alprenolol im Kulturmedium die Bindungseigenschaft des produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors zu  $[^3\text{H}]\text{CGP-12177}$  beeinflusst. Dazu wurden die BHK-21-Zellen nach der Infektion sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $2\text{ }\mu\text{M}$  Alprenolol inkubiert und nach 20 Stunden die Membranen präpariert.

Die hyperbolischen Sättigungskurven für die Membranen aus beiden Ansätzen zeigten eine sättigbare Bindung des Antagonisten  $[^3\text{H}]\text{CGP-12177}$  (Abb. 3.18). Mittels Scatchard-Analyse wurden die Rezeptorkonzentration  $B_{\text{max}}$  und die Dissoziationskonstante  $K_D$  ermittelt. Die Membran der Zellen, die in Anwesenheit von Alprenolol inkubiert wurden, zeigte eine Rezeptorkonzentration von  $67,5\text{ pmol/mg}$  Membranprotein, im Vergleich zu  $7,5\text{ pmol/mg}$  Membranprotein in der Membran von den Zellen, die in Abwesenheit von Alprenolol inkubiert wurden. Die Linearität der Regressionsgerade zeigte das Vorhandensein einer homogenen Rezeptorpopulation in beiden Fällen. Der  $K_D$ -Wert von  $2,7\text{ nM}$  bzw.  $7,5\text{ nM}$  liegt um einen Faktor von 10 niedriger als die publizierten Werte. Daraus lässt sich schließen, daß der Ligand Alprenolol im Medium die Rezeptorproduktion erhöhen kann, die Bindungscharakteristik des heterolog produzierten Rezeptors jedoch nicht ändert.

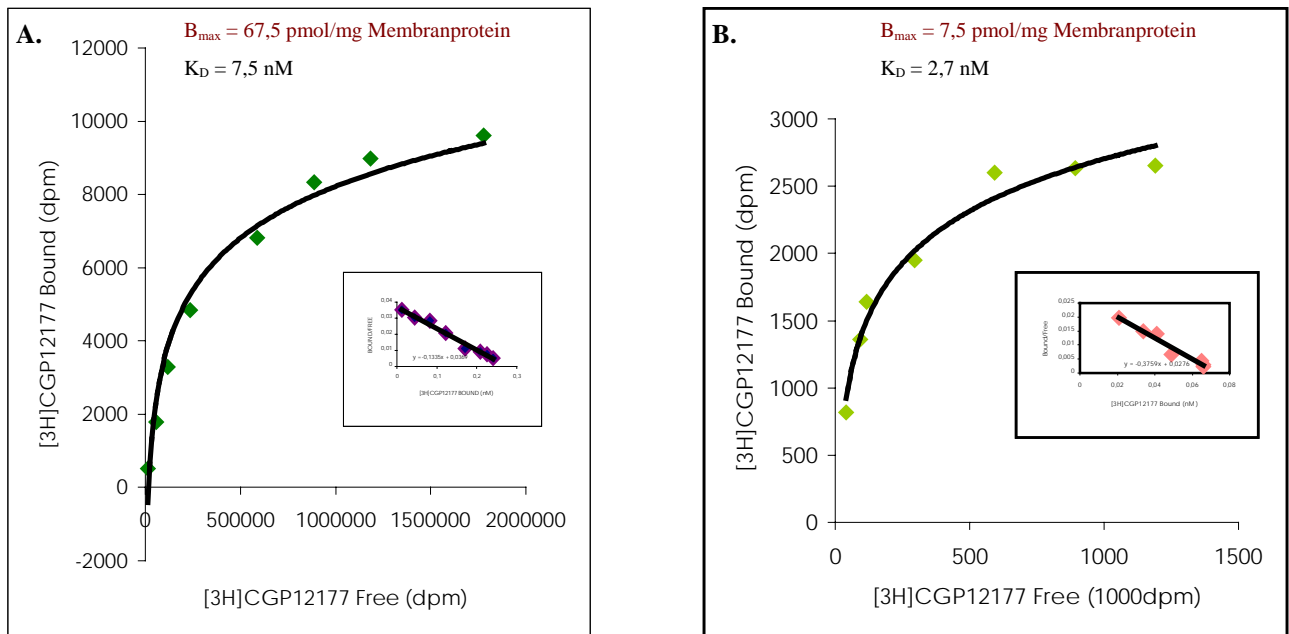


Abb. 3.18: Bindung von  $[^3\text{H}]\text{CGP-12177}$  in Sättigungsexperimenten an Membranen präpariert aus den mit dem Virus SFV-CAP $\beta_2\text{ARHis}$  infizierten BHK-21-Zellen. (A): Die Zellen wurden nach der Infektion in Anwesenheit von  $2\text{ }\mu\text{M}$  Alprenolol inkubiert. (B) Die Zellen wurden nach der Infektion im Medium ohne Zugabe von Alprenolol inkubiert.

### 3.5.4 Kopplung des rekombinanten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors an endogene G-Proteine in Säugerzellen

Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor kann an ein stimulatorisches  $G_s$ -Protein koppeln und somit die Adenylatzyklase aktivieren. Dies führt zu einer Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Um die Funktionalität des heterolog produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit der cAMP-Spiegel in mit den rekombinanten Viren infizierten BHK-21-Zellen gemessen. Die Messung der cAMP-Konzentration in der Zelle erfolgte mit Hilfe eines Enzym-Immunoassay (siehe Kapitel 2.8.8).

Es zeigte sich, dass eine quantitative Messung des cAMP-Spiegels in BHK-21-Zellen nicht einfach durchzuführen war. Es ist möglich, daß die endogene Proteinsynthese der Zelle durch Infektion des rekombinanten *Semliki Forest Virus* ausgeschaltet und das endogene  $G_s$ -Proteine bzw. die Adenylatzyklase nicht in ausreichenden Mengen gebildet wurde. Nach zahlreichen Vorversuchen stellte sich heraus, daß die CHO-K1-Zellen sich für die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration besser eignen als die BHK-21-Zellen. Nach einer kurzen Infektionszeit von 15 Stunden erreichten die mit SFV-CAP $\beta_2$ ARHis infizierten CHO-K1-Zellen ein für die Messung erforderliches Expressionsniveau von ca.  $1 \times 10^6$  Rezeptoren pro Zelle und wurden geerntet. Der Einfluss von Agonist Noradrenalin, Antagonist Alprenolol und einem direkten, rezeptorunabhängigen Aktivator der Adenylatzyklase (Forskolin) auf die cAMP-Akkumulation in der Zelle wurde untersucht.

Das Ergebnis in Abbildung 3.19 zeigte, daß der basale cAMP-Spiegel in infizierten Zellen viel höher war als der in nicht-infizierten Zellen. Durch Forskolin wurde der cAMP-Spiegel in nicht-infizierten Zellen um das Zweifache erhöht, in infizierten Zellen lediglich um 35%. Diese Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation konnte nur in infizierten Zellen durch  $\beta_2$ -adrenergen Antagonisten Alprenolol gehemmt und durch Agonist Noradrenalin verstärkt werden. Damit wurde demonstriert, daß der heterolog produzierte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor funktionell an endogene G-Proteine koppeln kann und somit die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cAMP erhöht wird.

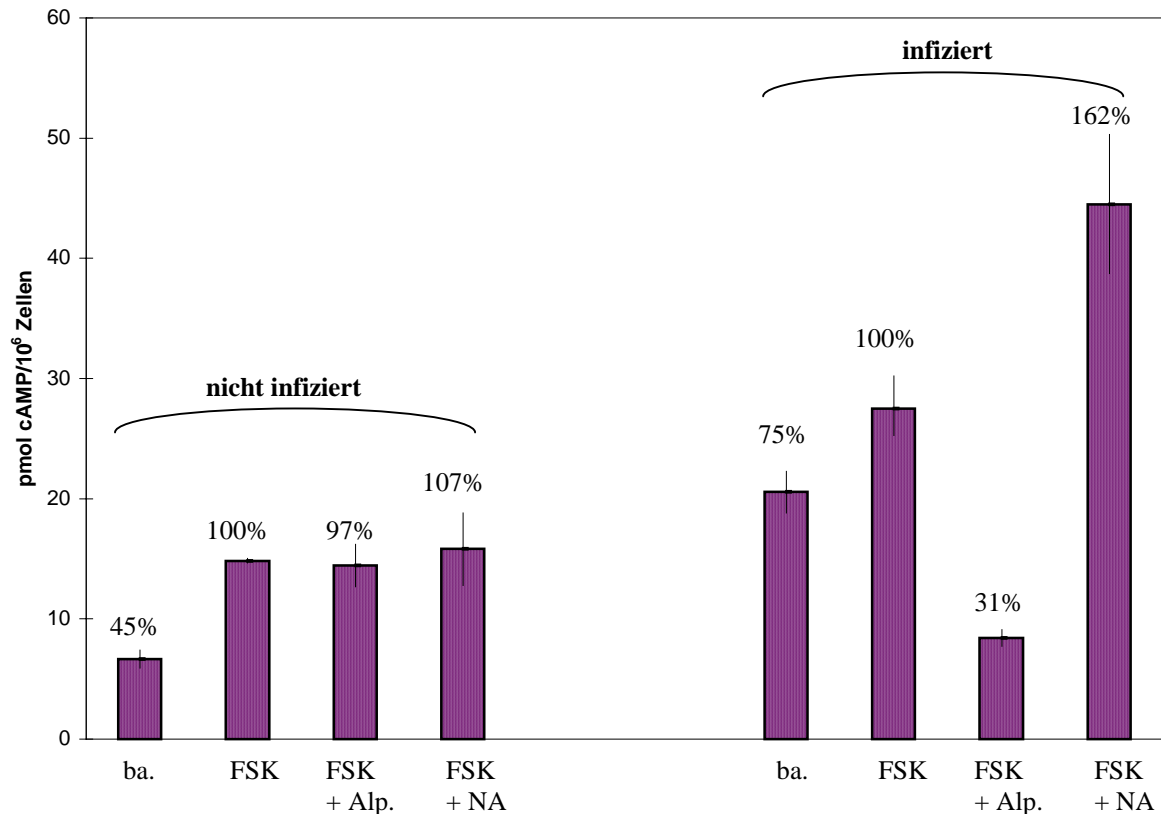


Abbildung 3.19: Einfluss von Agonist bzw. Antagonist auf die FSK-stimulierte cAMP-Akkumulation in  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor produzierenden CHO-1-Zellen. FSK: 10  $\mu$ M Forskolin; Alp.: 1  $\mu$ M Alprenolol; NA: 10  $\mu$ M Noradrenalin. Die Zahlen über den Balken zeigen die cAMP-Konzentration als prozentualen Anteil der FSK-stimulierten cAMP-Akkumulation (=100%) in den jeweiligen Zellen an. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 10 mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis.

### 3.6 Produktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Suspensionskultur

In dieser Arbeit wurde die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Suspensionskultur etabliert, um ein „scale-up“ der Produktion zu ermöglichen. Dazu wurde eine BHK-Zelllinie (C13-2P) verwendet, die bereits an das Wachstum in Suspension adaptiert war. Die Kultivierung von BHK-Zellen in Suspension erfolgte in Spinnerflaschen (siehe Kap. 2.7.2).

Ähnlich wie bei der adhärenenten Kultur wurde der Einfluss der Infektionsmultiplizität (MOI) auf die Produktionsrate des Rezeptors in Suspensionskultur untersucht. Dazu wurden die BHK-21-Zellen in 500 ml Suspensionskultur mit dem rekombinanten Virus SFV-CAP $\beta_2$ ARHis mit MOIs im Bereich von 50-200 infiziert. Nach 24 Stunden wurden Membranen präpariert und Ligandenbindungstests mit [ $^3$ H]CGP-12177 durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Rezeptorproduktion stieg, ähnlich wie in adhärenenten Kultur, proportional mit zunehmender Infektionsmultiplizität (Abb. 3.20).



In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob der positive Effekt von zunehmender MOI auf die Ausbeute durch die Zugabe von Antagonist Alprenolol und DMSO ins Kulturmedium verstärkt werden konnte. Dazu wurden die BHK-21-Zellen in 250 ml Kultur mit dem rekombinanten Virus SFV-CAP $\beta_2$ ARHis mit einer MOI von 80 infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen in Anwesenheit von 1-5  $\mu$ M Alprenolol und 0,5-2% DMSO kultiviert. Nach 24 Stunden wurden Membranen präpariert und Ligandenbindungstests mit [ $^3$ H]CGP-12177 durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß durch die Zugabe von Alprenolol und DMSO die Ausbeute erhöht werden konnte. Bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Alprenolol und 0,5% DMSO im Medium konnte eine Ausbeute von 23,7 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erreicht werden (Abb. 3.20).

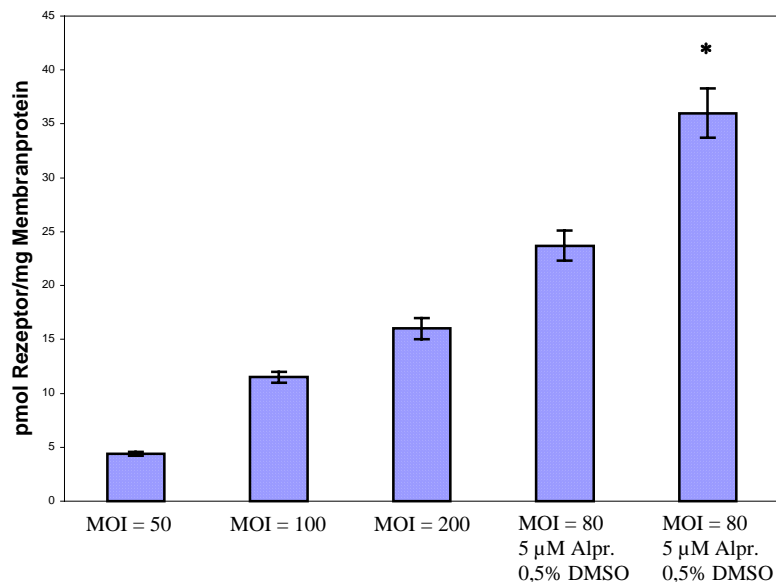


Abb. 3.20: Produktionsrate des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in 250 ml bzw. 500 ml BHK-Suspensionskultur. Die Zellen wurden mit dem Viruskonstrukt SFV-CAP $\beta_2$ ARHis infiziert. \*: Die Zellen wurden nach der Infektion in Petrischalen aus Polystyrol kultiviert.

Im Gegensatz zu adhären Zellen erfolgte die Infektion im Kulturmedium (siehe Kap.2.8.4). Außerdem stellte sich heraus, daß die Inkubation von infizierten Zellen unter Rühren in Suspensionskultur einen negativen Einfluss auf die Ausbeute hatte. Deshalb wurden die Zellen nach der Infektion in Petrischalen aus Polystyrol statt in Spinnerfalschen kultiviert. Der optimale Erntezeitpunkt wurde ebenfalls ermittelt und lag zwischen 20 und 22 Stunden nach der Infektion. Unter dieser Bedingung konnte eine Ausbeute von 36,0 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erzielt werden. Im Vergleich zu der Ausbeute von 23,7 pmol pro mg Membranprotein in Spinnerflaschen betrug die Steigerung von 52%. Aus 1 Liter Suspensionskultur konnte damit ca. 0,2 mg Rezeptorprotein gewonnen werden.

### 3.7 Aufbruch von SFV-infizierten BHK-Zellen und Membranpräparation

In dieser Arbeit wurden für die Produktion des Rezeptors adhärente BHK-21-Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 144 mm kultiviert. Zur Optimierung der Rezeptorproduktion wurden die Zellen in einzelnen Schalen nach der Infektion mit den rekombinanten Viren unter verschiedenen Bedingungen für einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine Membranpräparation durchgeführt. Für die Durchmusterung verschiedener Bedingungen sollten Membranen für jede einzelne Kulturschale präpariert werden. Die Membranpräparation in kleinem Maßstab erfolgte mit der Glasperlen-Methode und anschließender Ultrazentrifugation (siehe Kap.2.8.6.1). Bei dem Aufschluss mit Glasperlen waren über 90% der BHK-21-Zellen aufgeschlossen. Von den Zellen aus einer  $\varnothing$  144 mm Kulturschale (ca.  $1,5 \times 10^7$  Zellen) konnten durchschnittlich 2 mg Membranprotein gewonnen werden.

Zum Aufschluß von BHK-Suspensionszellen im präparativen Maßstab wurde zunächst die Parr-Bombe eingesetzt (siehe Kap.2.8.6.2). Mit dieser Methode war es möglich pro Durchlauf Zellen aus maximal 2 Liter Suspensionskultur (ca.  $3 \times 10^9$  Zellen) zu verarbeiten. Bis zu 65% der Zellen konnten aufgebrochen werden. Die nicht aufgebrochenen Zellen konnten durch eine *low-spin* Zentrifugation (500 g) gesammelt und zum Aufbruch wieder in die Parr-Bombe überführt werden. Beim Zellaufschluss mit der Parr-Bombe wurde eine starke Schaumbildung beobachtet. Von den BHK-Suspensionszellen aus 1 Liter Kultur konnten mit dieser Methode durchschnittlich 100 mg Membranprotein gewonnen werden.

Als weitere Methode wurde der Zellaufschluß im präparativen Maßstab in der *French-Press* getestet (siehe Kap.2.8.6.3). Es stellte sich heraus, daß bei den BHK-Zellen bereits nach dem ersten Durchgang ein Aufschlussgrad von 80% erreicht werden konnte. Nach 2 Durchgängen konnten fast 100% der Zellen aufgebrochen werden. Dabei war die Schaumbildung minimal. Der Aufschluß der Zellen aus 1 Liter Suspensionskultur konnte innerhalb von 10 min ausgeführt werden, wobei die Ausbeute an Membranprotein um 20% höher lag als die mit der Parr-Bombe. Deshalb wurden weitere Membranpräparationen von BHK-Zellen im präparativen Maßstab mit der *French-Press* durchgeführt.

Die Produktion großer Mengen an Rezeptorprotein konnte auch mit adhärenen BHK-Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden  $6 \times 10^8$  Zellen aus 40 Kulturschalen ( $\varnothing$  144 mm) mit den rekombinanten Viren infiziert und nach 20 Stunden für die Membranpräparation geerntet. Die Membranpräparation wurde mit der *French-Press* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die

Ausbeute an Membranprotein bei den adhärennten Zellen mit durchschnittlich  $0,14 \text{ mg}/10^6$  Zellen fast doppelt so hoch lag wie bei den Suspensionszellen.

Durch niedrige Temperatur ( $4^\circ\text{C}$ ) und Zugabe von Proteaseinhibitoren (Leupeptin, PMSF, Pepstatin und Bacitracin) konnte der proteolytische Abbau des Rezeptors bei der Membranpräparation stark reduziert werden. Der Verlust an Ligandenbindung während der Membranpräparation betrug ca. 10%.

### 3.8 Solubilisierung des $\beta 2$ -adrenergen Rezeptors aus Membranen von BHK-21-Zellen

Für die Solubilisierung von Membranproteinen musste ein geeignetes Detergenz gefunden werden, welches das Membranprotein in ausreichendem Umfang funktionell aus den Membranen löst. Für das betreffende Membranprotein aus einem bestimmten Membrantyp muss das geeignete Detergenz individuell ermittelt werden. Da ionische Detergenzien generell stärker denaturierend wirken, werden für Membranproteine hauptsächlich nicht-ionische und zwitterionische Detergenzien eingesetzt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Detergenzien zur Solubilisierung des Rezeptors getestet. Dabei wurden die Membranen mit Hepes-Puffer (s. 2.1.3) auf eine Proteinkonzentration von 2-5 mg/ml eingestellt. Die Detergenzien wurden auf eine Konzentration eingestellt, die dem 10-100 fachen ihrer kritischen Mizellenkonzentration (CMC) entsprach. Nach einer Solubilisierungszeit von 1-2 h bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die ungelösten Membranbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die Solubilisierungseffizienz wurde durch Ligandbindungstests mit [ $^3\text{H}$ ]CGP-12177 ermittelt. Bei *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid lag die Solubilisierungsrate bei 90%. Digitonin zeigte eine Solubilisierungsrate von 50% bei einer Detergenzkonzentration von 1%. Mit allen anderen getesteten Detergenzien, wie *n*-Octyl- $\beta$ -D-maltosid, *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltosid, *n*-Undecyl- $\beta$ -D-maltosid, CHAPS, Cholat, Desoxycholat, Fos12, Fos14 und Fos16 konnten nur niedrige Solubilisierungsausbeute  $<10\%$  erzielt werden.

Zur Erhöhung der Ausbeute wurden bei der Solubilisierung mit *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid verschiedene Parameter wie Detergenzkonzentration, Solubilisierungszeit, pH-Wert und Ionenstärke variiert. Die Solubilisierung wurde bei Detergenzkonzentrationen von 0,5-2% durchgeführt. Dabei konnte mit 1,5 % *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid bei pH 7,4, 100mM NaCl und 2 h Solubilisierungszeit eine höchste apparente Solubilisierungsrate von 107% erzielt werden. Bei weiteren Versuchen, bei denen der pH-Wert von 7,4 auf 8,0 bzw. die Ionenstärke von 100 auf 500 mM erhöht wurde, konnte keine bessere Solubilisierungsausbeute gezeigt werden.

Auch eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Solubilisierungszeit hatte keinen positiven Einfluss auf die Solubilisierungsausbeute.

### 3.9 Reinigung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

#### 3.9.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) mittels „HiLoad“-Chromatographie-System

In dieser Arbeit wurde die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors zur Aufreinigung und Anreicherung ausschließlich mit dem Konstrukt CAP $\beta_2$ ARHis durchgeführt. Mit Hilfe des C-terminalen Dekahistidin-Anhängsels konnte der rekombinante Rezeptor über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätsmatrix gereinigt werden. Die Reinigung wurde zunächst über Ni-NTA-Agarose mit dem „HiLoad“-Chromatographie-System (Pharmacia) durchgeführt.

In einem Vorversuch wurden 2,5 ml Solubilisat mit 430 pmol Rezeptor-Bindung auf 2 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix geladen, mit 20 mM Imidazol in Hepes-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 100mM NaCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % LM) gewaschen und mit Hilfe eines Imidazol-Stufengradienten von 50, 100, 200 und 500 mM eluiert. Die *Western Blot*-Analyse der eluierten Fraktionen zeigte, daß nur ein geringer Anteil des Rezeptors im Durchlauf und in der Wasch-Fraktion wiederzufinden war (Abb. 3.21). Die Elution des gebundenen Rezeptors begann bei 100 mM Imidazol. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei weiteren Reinigungen die Imidazol-Konzentration in Waschpuffer auf 40 mM erhöht und eine Imidazol-Konzentration von 100 mM zur Elution des gebundenen Rezeptors gewählt.

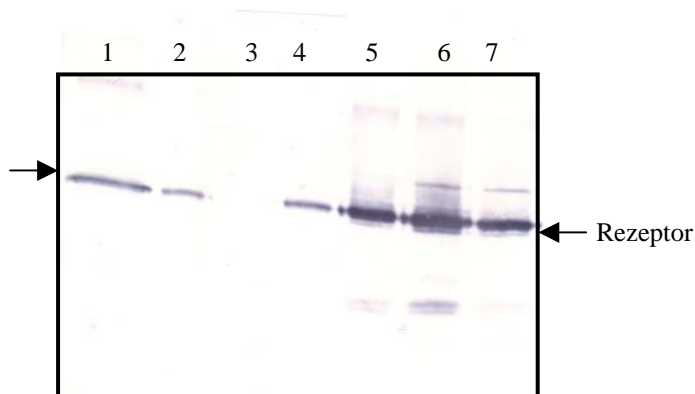


Abb.3.21: Western-Blot-Analyse einer Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors über einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule. Nachweis mit dem Anti-His-Antikörper. Spur 1: Durchlauf; Spur 2: Waschfraktion mit 20 mM Imidazol; Spur 3: Eluat mit 50 mM Imidazol; Spur 4: Eluat mit 75 mM Imidazol; Spur 5: Eluat mit 100 mM Imidazol; Spur 6: Eluat mit 150 mM Imidazol; Spur 7: Eluat mit 200 mM Imidazol.

Der anfängliche Reinigungsversuch zeigte, daß der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor über IMAC nur schwach angereichert werden konnte (Abbildung 3.22.A). Neben der schwachen 49 kDa Bande des Rezeptors waren noch mehrere Banden auf dem Silber-gefärbten Gel zu erkennen. Die *Western Blot*-Analyse deutet darauf hin, daß es sich bei den Banden zwischen 52 und 60 kDa möglicherweise um die glykosylierte Formen des Rezeptors handelt (Abbildung 3.22.B). Die 2 Banden im Bereich von 30 kDa sind möglicherweise Abbaubanden des Rezeptors. Die eingesetzten Proteaseinhibitoren hatten keinen Einfluss auf das Erscheinen dieser Banden.

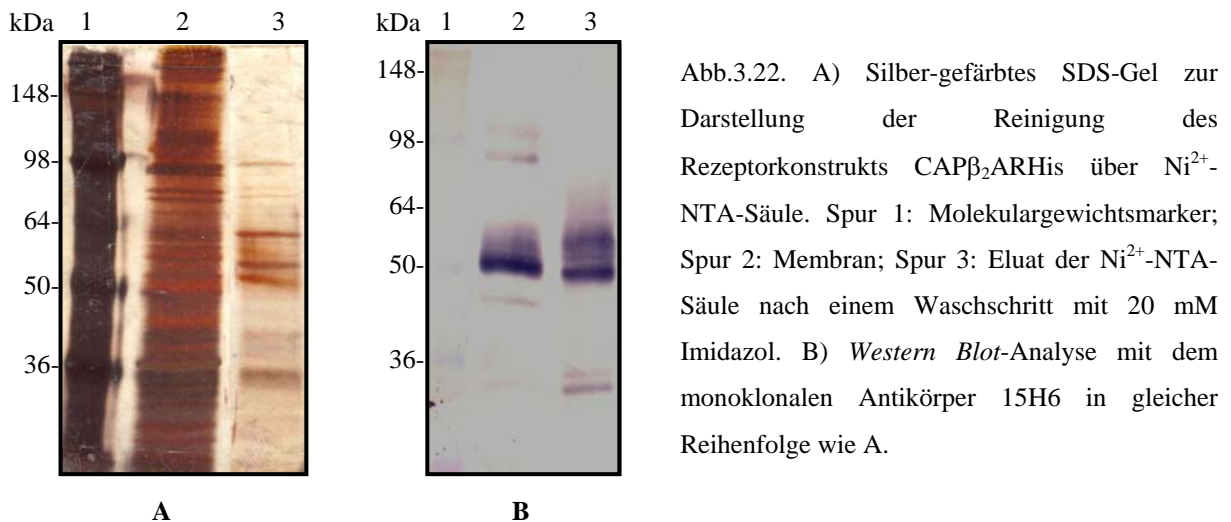


Abb.3.22. A) Silber-gefärbtes SDS-Gel zur Darstellung der Reinigung des Rezeptorkonstrukts CAP $\beta_2$ ARHis über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 2: Membran; Spur 3: Eluat der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule nach einem Waschschriff mit 20 mM Imidazol. B) *Western Blot*-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 15H6 in gleicher Reihenfolge wie A.

Bei weiteren Reinigungsversuchen wurden die BHK-21-Zellen nach der Infektion in Anwesenheit von 5  $\mu\text{g/ml}$  Tunicamycin inkubiert, um die Glykosylierung des produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors zu blockieren. Das Ergebnis der Reinigung über IMAC zeigt die Abbildung 3.24. Auf dem Silber-gefärbten Gel waren neben der dominanten Rezeptorbande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 49 kDa nur schwache unspezifische Banden im Bereich von 60 kDa und bei 30 kDa die mögliche Abbaubande des Rezeptors zu sehen. Im Gegensatz zur vorherigen Reinigung war kein glykosylierter Rezeptor zu erkennen. Anhand des SDS-Gels wurde die Reinheit des Rezeptors auf 80 % geschätzt.

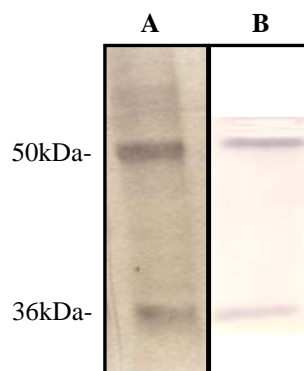


Abb.3.23. A) Silber-gefärbtes SDS-Gel zur Darstellung der Reinigung des Rezeptorkonstrukts CAP $\beta_2$ ARHis über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule nach der Inhibition der Glykosylierung des Rezeptors. Eluat der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule. B) *Western Blot*-Analyse mit dem Anti-His-Antikörper.

Der gereinigte Rezeptor wurde mit Hilfe der Gelfiltration über eine Superose 12-Säule analysiert. Das Retentionsprofil in Abb. 3.24 zeigte ein Absorptionsmaximum bei einem Retentionsvolumen von 1,66 ml. Dabei handelt sich möglicherweise um die monomere Form des Rezeptors. Außerdem lässt das Retentionsprofil auch auf die Präsenz von aggregiertem Rezeptor schließen.

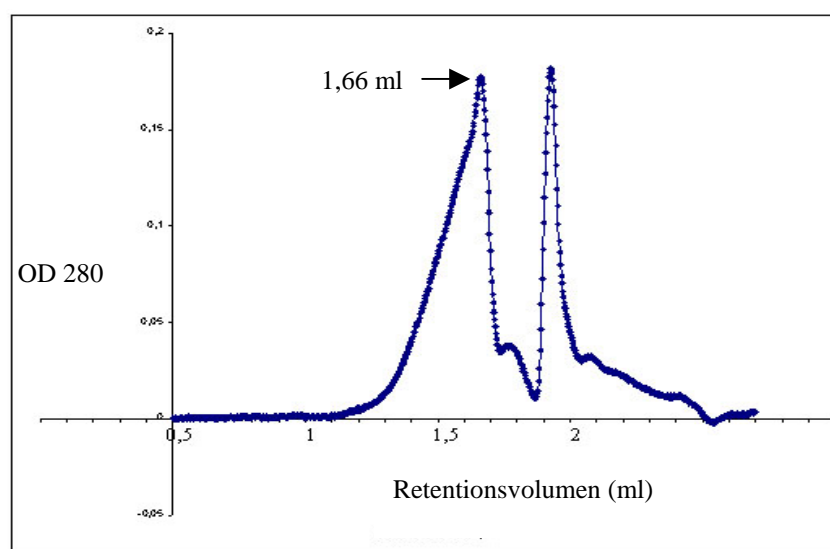


Abb.3.24: Retentionsprofil (Superose 12) des gereinigten Rezeptors (Eluat der Ni-NTA-Säule).

Die Gesamtausbeute des Rezeptors nach der IMAC betrug 19,9 % (Tab.3.5). Auffällig war der große Verlust des bindungsaktiven Rezeptors im Durchlauf (51,2%). Auf dem *Western Blot* mit dem monoklonalen Anti-His-Antikörper zeigte die Durchlauf-Fraktion nur ein schwaches Signal.

Tabelle 3.5: Reinigung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors über $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule mit dem HiLoad-System.					
	Gesamtbindung (pmol)	Ausbeute (%)	Spez. Bindungs- aktivität (pmol/mg)	Gesamt- protein (mg)	Anreicherung
Membran	429,5	100	18,2	23,6	-
Solubilisat	423,2	98,5	20,8	20,3	1,1
Durchlauf	216,6	(51,2)	-	14,9	-
Waschen	66,0	(15,6)	-	4,2	-
Eluat	84,1	19,9	1401,7	0,06	77,0
Die angegebenen Werte beziehen sich auf 4 unabhängige Reinigungen.					

### 3.9.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) mittels „ÄKTA“-Chromatographie-System

Die Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors im großen Maßstab wurde an der HisTrap-HP-Säule (Amersham) mit Hilfe des ÄKTA-Chromatographie-Systems durchgeführt. Es wurde eine Reinigung mit 25 ml Solubilisat mit 4717 pmol Rezeptorbindung aus 2 L BHK-Suspensionskultur durchgeführt. Die Probe wurde auf 1 ml HisTrap-Hp-Säule aufgetragen, mit 20 mM Imidazol in Hepes-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 100mM NaCl, 12 mM  $MgCl_2$ , 0,1 % LM) gewaschen und mit Hilfe eines Imidazol-Stufengradienten von 50, 100, 200 und 500 mM eluiert. Das eingezeichnete Profil zeigte, das die gebundenen Proteine bei einer Imidazol-Konzentration von 100 mM eluiert wurden (Abb. 3.25.A). Das Eluat wurde durch eine TCA-Proteinfällung konzentriert und einer SDS-PAGE unterzogen (Abb. 3.25.B). Auf dem Silbergefärbten Gel waren neben dem Rezeptor noch einige Proteinbanden zu erkennen. Zwei weitere Reinigungen zeigten, dass es nicht möglich war den Rezeptor mit einem einzigen Schritt zu reinigen.

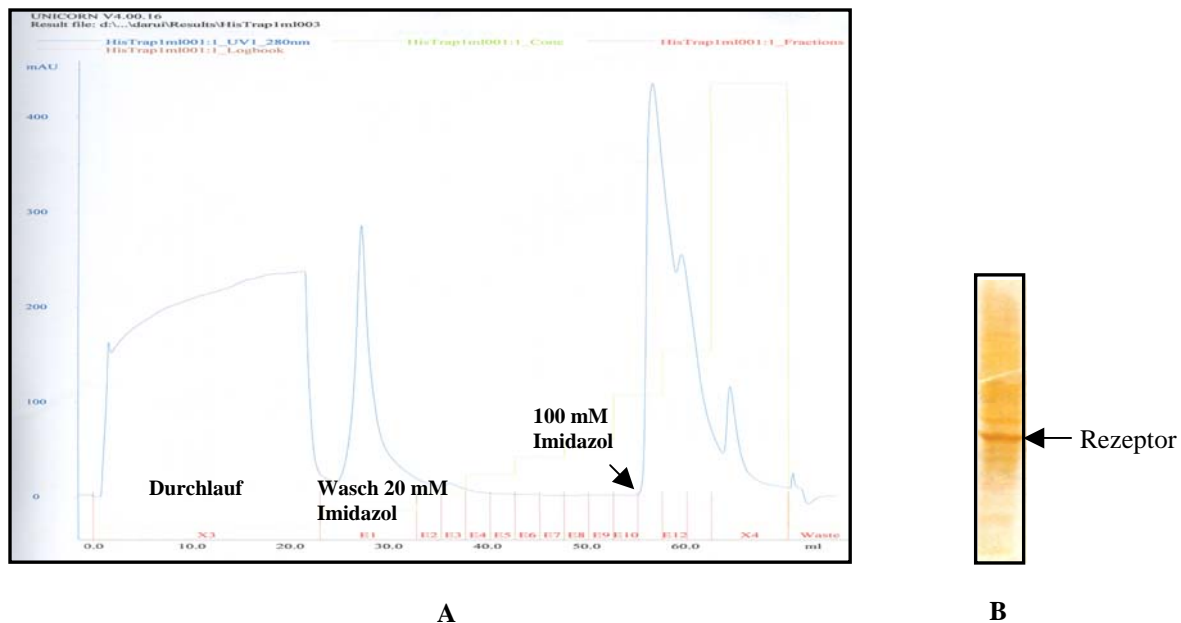


Abb.3.25. A): Chromatographie-Profil der Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors über die HisTrap-HP-Säule mit dem ÄKTA-System. B): Silber gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Eluat von A.

Eine Zusammenfassung der Reinigung ist in Tab.3.6 dargestellt. Der Verlust an Liganden-bindungsaktivem Rezeptor im Durchlauf betrug hier 38,4%.

**Tabelle 3.6: Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors über HisTrap-HP-Säule.**

	Gesamtbindung (pmol)	Ausbeute (%)	Spez. Bindungsaktivität (pmol/mg)	Gesamtprotein (mg)	Anreicherung
Membran	4717	100	20,9	225	-
Solubilisat	3943	83,6	19,4	203	
Durchlauf	1516	(38,4)	-	-	-
Waschen	238	(6,0)	-	-	-
Eluat	473	10,0	788	0,6	40,6



## 4. Diskussion

Eine heterologe Produktion von GPCRs und Ionenkanälen mittels *Semliki Forest* Virus-Expressionssystem in Säugerzellen konnte in vielen Fällen gezeigt werden. So wurde z.B. der humane Neurokinin 1 (NK1)-Rezeptor mit 6 pmol pro mg Membranprotein (Lundstrom *et al.*, 1995), der  $\alpha_{1b}$ -adrenerge Rezeptor mit 24 pmol pro mg Membranprotein (Scheer *et al.*, 1999), der 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor aus Maus mit  $8 \times 10^6$  Rezeptoren pro Zelle (Blasey *et al.*, 2000), der Histamin H<sub>2</sub>-Rezeptor mit 50 pmol pro mg Membranprotein (Hoffmann *et al.*, 2001), der  $\alpha_{2b}$ -adrenerge Rezeptor mit 173 pmol pro mg Membranprotein (Sen *et al.*, 2003) und der Cannabinoid (CB<sub>2</sub>)-Rezeptor aus Maus mit 25 pmol pro mg Membranprotein (Olson *et al.*, 2003) produziert. In der hier vorliegenden Arbeit sollte das SFV-Expressionssystem für die heterologe Produktion des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Hinblick auf spätere Kristallisation etabliert und optimiert werden.

### 4.1 Produktion von rekombinanten *Semliki Forest* Virus-Partikeln

Der erste Schritt zur Optimierung des SFV-Expressionssystems erfolgte bei der *in vitro* Transkriptionsreaktion. Es stellte sich heraus, dass die Qualität der Vektor-DNA für die RNA-Produktion von entscheidender Bedeutung war. Hierbei war vor allem eine vollständige Linearisierung der Vektor-DNA mit anschließender Reinigung ein wichtiger Faktor. Andere Faktoren, wie die Menge der Vektor-DNA, das GTP/CAP-Analogon-Verhältnis im Reaktionsansatz, die Reaktionstemperatur und -dauer sowie die Qualität der SP6 RNA Polymerase haben keinen großen Einfluss auf die RNA-Ausbeute.

Bei der *in vitro* Transkription wurde außerdem beobachtet, dass die Ausbeute der kürzeren Helfer-RNA stets höher als die der längeren pSFV-RNA war. Möglicherweise spielt die Größe der Transkripte für die RNA-Produktion eine wichtige Rolle. Je länger die Transkripte, desto häufiger treten Fehler bei der Transkriptionsreaktion auf und die RNA-Ausbeute wird infolgedessen niedriger. Die Ursache für die unterschiedliche Ausbeute der Transkription könnte auch in der Sequenz der Vektor-DNA liegen.

Nach der Optimierung der *in vitro* Transkription wurde weiterhin untersucht, welche Schritte der Virusproduktion zu einer erhöhten Ausbeute an infektiösen Partikeln führen konnten. Als Elektroporationslösung erwies sich PBS-Puffer am besten geeignet. Es wurde außerdem eine Elektroporationsbedingung gefunden, unter der die meisten Zellen überleben und eine hohe

Gentransfer-Effizienz zeigen konnten. 20 Stunden nach der Elektroporation konnten Viren mit einem Virustiter von  $7,5 \times 10^8$  infektiöse Partikel pro ml geerntet werden. Der in der Literatur angegebene Virustiter von  $1 \times 10^9$  infektiöse Partikel pro ml konnte nahezu erreicht werden (Lundström *et al.*, 1999).

## 4.2 Produktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen

### 4.2.1 Rezeptorproduktion in adhärenter Zellkultur

Bisher wurde keine systematische Untersuchung im Hinblick auf einen möglichen Einfluss verschiedener N- und C-terminalen Fusionen auf die Ausbeute von GPCRs im SFV-Expressionssystem durchgeführt. Bei den in der Literatur beschriebenen Produktionen von GPCRs handelt es sich meistens um die Produktion der Wildtyp-Rezeptoren zur pharmakologischen Charakterisierung.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit dem SFV-Expressionssystem in Säugerzellen produziert. Verschiedene N- und C-terminale Fusionen wurden in Bezug auf deren Einfluss auf die Rezeptorproduktion untersucht. Dabei zeigten die Konstrukte mit C-terminalem Dekahistidin-Anhängsel eine höhere Ausbeute im Vergleich zu den Konstrukten mit N-terminalem Dekahistidin-Anhängsel. Möglicherweise wird der Einbau des Rezeptors in die Membran durch die positiven Ladungen der Histidinreste am N-Terminus erschwert. Eine C-terminale Fusion des Hexahistidin-Anhängsels wurde auch für die Expression des 5HT<sub>3</sub>-Rezeptors (Blasey *et al.*, 2000) und  $\alpha_{1b}$ -adrenergen Rezeptors (Björklöf *et al.*, 2002) mittels SFV-Expressionssystem verwendet. Beim 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor konnte eine Ausbeute von  $8 \times 10^6$  Rezeptoren pro Zelle erreicht werden. Nach der Membranpräparation und Solubilisierung mit Polyoxyethylen-9-Laurylether (C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>) konnte der Rezeptor durch Metallaffinitäts-Chromatographie über Ni-NTA-Agarose in einem einzigen Schritt gereinigt werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit N-terminalem Dekahistidin-Anhängsel über die Ni-NTA-Säule angestrebt.

Die Biotinylierungsdomäne der Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii* wurde zur Reinigung des Rezeptors über eine monomere Avidin-Säule eingesetzt. Ein positiver Effekt der Biotinylierungsdomäne auf die Überproduktion von GPCRs konnte sowohl in *P. pastoris* (Weiß, 1998; Reinhart, 2000) als auch in Insektenzellen (Grünwald, 1997; Ivanovic,

2001) gezeigt werden. Bei der Produktion des NK1-Rezeptors in CHO-Zellen mit dem SFV-Expressionssystem wurde jedoch ein negativer Effekt für die Biotinylierungsdomäne festgestellt (Lundstrom *et al.*, 1995). Das Konstrukt mit C-terminaler Biotinylierungsdomäne zeigte um 44% niedrigere Ausbeute als die des Wildtype-Rezeptors. In der vorliegenden Arbeit konnte kein positiver Effekt der C-terminalen Biotinylierungsdomäne mit den Rezeptor-Konstrukten His $\beta_2$ ARBio und CAPHis $\beta_2$ ARBio gezeigt werden.

Die *Kozak*-Sequenz spielt eine wichtige Rolle für die Translationsinitiation in Eukaryonten (Kozak, 1999). Diese Sequenz wurde in vielen eukaryotischen Expressionsvektoren vor das Start-Codon ATG eingefügt, um die Produktion des rekombinanten Proteins zu steigern (Sano *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2004). Die Hämagglutinin-Signalsequenz ist erforderlich für die funktionelle Expression und den Membrantransport vom Hämagglutinin-Protein des Influenza-Virus (Sekikawa & Lai, 1983). Eine Kombination aus *Kozak*-Sequenz und HA-Signal-Peptid wurden für die heterologe Produktion von Cholinacetyltransferase mit hoher Ausbeute in COS-1-Zellen verwendet (Robert & Quirin-Stricker, 1998). Für die Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit dem SFV-Expressionssystem konnte eine um 50% höhere Rezeptorproduktion für das Konstrukt KHAFlag $\beta_2$ ARHis mit der *Kozak*-Sequenz und HA-Signalsequenz festgestellt werden. Die hier verwendete verkürzte *Kozak*-Sequenz gilt als essentiell für eine optimale Initiation der eukaryotischen Translation und stimmt an der Position -6 und von Position -3 bis +4 mit der vollständigen *Kozak*-Sequenz überein (Kozak, 1986). Es wäre hier interessant in Zukunft auch den Einfluss der vollständigen *Kozak*-Sequenz auf die Proteinexpression im SFV-System zu untersuchen.

Das Gen des Kapsid-Proteins aus dem Genom des *Semliki-Forest*-Virus fungiert als ein *translational enhancer*-Signal und kann die Expression des rekombinanten Proteins bis zu 10 fach erhöhen (Lundstrom *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine Steigerung der Rezeptorproduktion mit der CAP-Sequenz um den Faktor 2 erzielt werden. Das Ausmaß der Produktionssteigerung durch die CAP-Sequenz scheint bei unterschiedlichen Rezeptoren variabel zu sein. Für die Produktion des  $\alpha_{2b}$ -adrenergen Rezeptors mit dem SFV-System wurde sogar ein negativer Effekt für die CAP-Sequenz beobachtet (Sen *et al.*, 2003).

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass N- und C-terminale Fusionen sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Rezeptorproduktion haben. Insgesamt war der dadurch erreichte Produktionslevel noch sehr niedrig (siehe Kapitel 3.4.3). Aus diesem Grund benötigte das SFV-Expressionssystem zur Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors weitere Optimierungen.

In einem viralen Expressionssystem wird das Expressionsniveau zum größten Teil von der Infektionsmultiplizität (MOI) beeinflusst. So stieg die rekombinante Produktion der  $\beta$ -Galaktosidase im SFV-Expressionssystem mit zunehmender MOI in einem Bereich von 4-400 (Blasey *et al.*, 1997). Ein ähnlicher Effekt der MOI wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit für die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors bei allen getesteten Rezeptorkonstrukten beobachtet. Die Möglichkeit zur Produktionssteigerung mit zunehmender MOI wurde im hier getesteten Bereich (bis zu MOI = 264) nicht ausgeschöpft. Möglicherweise könnte der Rezeptorproduktion durch eine weitere Erhöhung der MOI weiter gesteigert werden. Für die Produktion großer Mengen an Rezeptorprotein mit dem SFV-Expressionssystem wurde jedoch eine MOI unterhalb 100 gewählt, da bei höherer MOI die Virusproduktion zum limitierenden Faktor wird. Der Effekt von MOI lässt sich nur durch multiple Infektion erklären, da eine vollständige Infektion der BHK-21-Zellen bereits bei einer MOI von 10 erreicht wird. Je höher die MOI, desto mehr Kopien vom rekombinanten RNA-Molekülen gelangen in die Zellen und führen somit zu einer höheren Proteinexpression. Hier wäre es interessant, einen Vektor zu entwickeln, der mehrere Kopien der Expressionskassette besitzt. Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, mit weniger Viren eine höhere Ausbeute zu erreichen.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die erfolgreiche rekombinante Proteinproduktion mit dem SFV-Expressionssystem stellt die verwendete Zelllinie dar. Wegen des breiten Wirtsspektrums vom *Semliki Forest* Virus kann die heterologe Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden (Lundstrom, 2003). Für die Produktion von GPCRs wurden oft Säugerzellen wie z.B. BHK-21-, CHO-K1-, COS7- und HEK293-Zellen verwendet. Das Expressionsniveau für ein bestimmtes Protein kann in verschiedenen Wirtszellen stark variieren (Lundstrom, 2003). In dieser Arbeit wurden die oben genannten vier Zelllinien zur Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei den CHO-K1- und BHK-21-Zellen eine deutliche höhere Rezeptorproduktion im Vergleich zu den COS7- und HEK293-Zellen erreicht werden konnte. Obwohl die Ausbeute in CHO-K1-Zellen höher als in den BHK-21-Zellen lag, war die gesamte Ausbeute an funktionellem Rezeptor in BHK-21-Zellen höher. Ein anderer entscheidender Vorteil von BHK-21-Zellen gegenüber CHO-K1-Zellen war das schnellere Wachstum. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die BHK-21-Zellen für die Rezeptorproduktion in großen Mengen besser geeignet sind als die anderen drei Zelllinien.

In dieser Arbeit wurde eine zeitabhängige Untersuchung der Rezeptorproduktion durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass ein Maximum der Rezeptorproduktion in HEK-293-

und BHK-21-Zellen bereits 16 bzw. 20 Stunden nach Infektion erreicht wurde. Im Gegensatz dazu wurde der Rezeptor in COS7- und CHO-K1-Zellen erst 40 bzw. 42 Stunden nach Infektion am stärksten produziert. Dieser zeitliche Verlauf ist im Bereich dessen, was für verschiedene Rezeptoren in der Literatur angegeben wird. Für den humanen Neurokinin 1 (NK1)-Rezeptor wurde ein Maximum der Produktion in CHO-K1-Zellen 12 Stunden nach der Infektion gefunden (Lundstrom *et al.*, 1995). Sowohl für die Produktion des  $\alpha_{1b}$ -adrenergen Rezeptors in BHK-21-Zellen (Scheer *et al.*, 1999) als auch für die Produktion des Histamin  $H_2$ -Rezeptors in COS7-Zellen (Hoffmann *et al.*, 2001) wurde ein Maximum bei 40 Stunden nach der Infektion beobachtet. In einzelnen Wirtszelltypen war das zeitliche Produktionsmuster offenbar von dem individuellen Rezeptor abhängig.

Ein positiver Einfluss von Liganden im Induktionsmedium wurde für die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet (King *et al.*, 1990; Sizmann *et al.*, 1996). Bei der Produktion von GPCRs in *Pichia pastoris* wurde dieser Effekt für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor (Weiß, 1998; Reinhart, 2000), den Histamin  $H_1$ -Rezeptor (Ivanovic, 2001) und den Dopamin  $D_{2S}$ -Rezeptor (Grünwald, 2004) berichtet. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal für die heterologe Produktion in Säugerzellen gezeigt werden, dass die Zugabe von Liganden ins Kulturmedium eine signifikante Steigerung der Rezeptorproduktion bewirkt. Bemerkenswert war hierbei, dass bei immunologischer Untersuchung der Membranen zwischen den Proben mit und ohne Alprenolol kein sichtbarer Unterschied der Signalstärke zu erkennen war, wo hingegen der Liganden-Bindungstest eine 3,7-fache Erhöhung der bindungsfähigen Rezeptorpopulation zeigte. Dies könnte darauf hinweisen, dass durch die Anwesenheit des Liganden die gesamte Rezeptorproduktion nicht gesteigert, sondern nur der Anteil an bindungsfähigem Rezeptor in der gesamten Rezeptorpopulation erhöht wurde. Möglicherweise hat der Ligand eine stabilisierende Wirkung auf den Rezeptor. Es lässt sich spekulieren, dass der membranpermeable Ligand Alprenolol bereits während der Translation an den Rezeptor binden und dadurch die Faltung des Rezeptors begünstigen könnte.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Infektion in PBS-Puffer im Vergleich zu der in Kulturmedium zu einer höheren Ausbeute führen konnte. Möglicherweise hat die komplexe Zusammensetzung des Kulturmediums einen negativen Einfluss auf die Infektion. Außerdem hat PBS als Pufferlösung vermutlich einen besser stabilisierenden Effekt auf die rekombinanten Viren.

Unter den optimierten Bedingungen konnte bei einer MOI von 150 und 2  $\mu$ M Alprenolol im Medium eine Produktionsrate von 49,6 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein in adhärenter

Zellkultur erreicht werden. Im Vergleich zur anfänglichen Produktion war das eine Steigerung um das Dreißigfache.

#### 4.2.2 Rezeptorproduktion in Suspensionskultur

Die Produktion großer Mengen an Rezeptorprotein mit adhärenenten BHK-21-Zellen ist sehr arbeitsintensiv. Für dieselbe Menge an Zellen aus 1 l Suspensionskultur benötigt man für adhärenente Kultur ca. 70 Kulturschalen ( $\varnothing$  144 mm). Das bedeutet längere Arbeitszeit und die Gefahr einer Kontamination der Zellkultur ist höher als bei der Suspensionskultur in Spinnerflaschen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in großem Maßstab in Suspensionskultur durchgeführt. Die Produktion von Membranproteinen in Suspensionskultur mit dem SFV-Expressionssystem konnte bereits für den 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor mit einer Ausbeute von 15 mg Rezeptorprotein aus 11,5 l Suspensionskultur durchgeführt werden (Blasey *et al.*, 2000).

Die BHK-Suspensionszellen können in Spinnerflasche eine sehr hohe Zelldichte von  $3 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> erreichen. Versuche mit verschiedenen Zelldichten ergaben, dass eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> ideal für die Infektion war. Bei dieser Zelldichte befinden sich die meisten Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und sind deshalb gut infizierbar. Die Infektion der Suspensionskultur erfolgte nicht in PBS-Puffer sondern in Kulturmedium. Im Gegensatz zu adhärenenten Zellen konnten sich die Suspensionszellen nach einer Inkubation in PBS-Puffer schlechter erholen und zeigten eine niedrigere Vitalität.

Die Produktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Suspensionskultur musste ebenfalls optimiert werden. Es war anzunehmen, dass die Faktoren, die die Produktion in adhärenenter Kultur beeinflussen, auch für die Optimierung der Suspensionskultur von großer Bedeutung sind. Aus diesem Grund wurden die Einflüsse von MOI, Liganden und DMSO auf die Rezeptorproduktion in Suspension untersucht. Es zeigte sich, dass die Ausbeute des Rezeptors, ähnlich wie in adhärenenter Kultur, proportional mit zunehmender Infektionsmultiplizität stieg. Auch die Zugabe von Antagonist Alprenolol und DMSO ins Kulturmedium bewirkte eine erhöhte Rezeptorproduktion in BHK-Suspensionszellen. Bei einer MOI von 100 und in Anwesenheit von 5  $\mu$ M Alprenolol sowie 0,5% DMSO im Medium konnte eine Ausbeute von 23,7 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erreicht werden. Als Voraussetzung für eine Anreicherung und Aufreinigung des rekombinanten Rezeptorproteins zwecks Kristallisation gilt, dass mindestens 1 mg Rezeptor aus 5 Liter Kulturvolumen produziert wird, was eine minimale Ausbeute von 26 pmol Rezeptor / mg Membranprotein in

eukaryotischen Zellen entspricht (Sarramengna *et al.*, 2003). Die hier erreichte Ausbeute des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Spinnerflasche lag noch unterhalb dieses Kriteriums.

Die Kulturbedingungen von infizierten Zellen spielte auch eine wichtige Rolle für die Rezeptorproduktion. Es stellte sich heraus, dass die Inkubation unter Rühren in Suspensionskultur einen negativen Einfluss auf die Rezeptorproduktion hatte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der mechanische Stress sein, dem die Zellen durch die Rührpendel in der Spinnerflasche ausgesetzt sind. Aus diesem Grund wurden die Zellen nach der Infektion in Petrischalen aus Polystyrol statt in Spinnerflaschen kultiviert. Unter dieser Bedingung konnte eine Produktionsrate von 36,0 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein erzielt werden. Ein weiterer positiver Effekt könnte die bessere Sauerstoffzufuhr aufgrund der größeren Oberfläche bei der Petrischale im Vergleich zur Spinnerflasche sein.

#### 4.3 Charakterisierung des produzierten $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen

G-Protein gekoppelte Rezeptoren befinden sich im nativen Gewebe hauptsächlich in der Plasmamembran der entsprechenden Zelle. Für die Signaltransduktion hat die richtige Lokalisation des Rezeptors in der Plasmamembran eine entscheidende Bedeutung. Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor besitzt keine bekannte Signalsequenz für den Transport zur Plasmamembran. Über den Mechanismus, wie der Rezeptor durch den intrazellulären Transportweg zur Plasmamembran gesteuert wird, ist noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte für den in BHK-21- und HEK-293-Zellen produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor bei Immunogoldmarkierung gezeigt werden, dass der Rezeptor überwiegend in den Membrankompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert war. Nur sehr wenige Rezeptoren konnten in der äußeren Plasmamembran nachgewiesen werden. Das Rezeptorkonstrukt mit der Hämagglutinin-Signalsequenz zeigte das gleiche Verhalten. Ähnliche Beobachtung wurde auch für die Produktion des  $\alpha_{2b}$ -adrenergen Rezeptors mit dem SFV-Expressionssystem im CHO-K1-Zellen gemacht (Sen *et al.*, 2003). Es ist unklar, warum es zu der falschen Lokalisierung des Rezeptors kommt, da praktisch alle Säugerzelle die notwendigen Komponenten für den Membrantransport besitzen. Ein ineffizienter Membrantransport scheint ein allgemeines Problem für die heterologe Expression von GPCRs zu sein. Beispielweise konnten eine hauptsächlich intrazelluläre Verteilung auch für die in *Pichia pastoris* (Weiß, 1998; Reinhart, 2000) und Insektenzellen (Grünwald, 1997) produzierten GPCRs festgestellt werden. Möglicherweise wurde der intrazelluläre

Transportsweg zur Plasmamembran durch die Überproduktion des rekombinanten Rezeptors überbelastet.

Für die Produktion von zwei Geruchsrezeptoren, I7 und OR5 aus Maus, mit dem SFV-Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren, wenn produziert in BHK-21-Zellen, nicht zur Membran transportiert, während sie in den Mausgeruchszellen jedoch korrekt in die Plasmamembran inseriert wurden (Monastyrskaia *et al.*, 1999). Die intrazelluläre Retention des heterolog produzierten Proteins könnte daher auch auf die Besonderheiten der Wirtzelllinien zurückzuführen sein.

Das in dieser Arbeit verwendete Rezeptorkonstrukt hat 2 Konsensus-Sequenzen für N-Glykosylierung. Das gleiche Rezeptorkonstrukt wurde in *Pichia pastoris* nicht glykosyliert (Reinhart, 2000). In dieser Arbeit wurde die N-Glykosylierung des in BHK-21-Zellen produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors untersucht. Durch die Behandlung der gewonnenen Membranen mit Tunicamycin und Endoglykosidase H konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor teilweise glykosyliert wurde, und dass die N-Glykane möglicherweise zum mannosereichen Typ gehörte. Die glykosylierte Form des Rezeptors erhöhte die apparente Molekularmasse im SDS-Gel um 3-8 kDa. Hierbei war unklar, ob die beide Konsensus-Sequenzen glykosyliert wurden. Es lässt sich vermuten, dass nur eine Konsensus-Sequenz des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors glykosyliert wurde. Der Grund dafür war die Beobachtung, dass der in BHK-21-Zellen produzierte  $\alpha_{1B}$ -adrenerge Rezeptor glykosyliert wurde, wobei pro N-Glykane die apparente Molekularmasse sich um 3-6 kDa erhöhte (Björklöf *et al.*, 2002).

Für den in BHK-21-Zellen produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor wurde die spezifische Ligandenbindung untersucht. Eine Dissoziationskonstante von 2,7 nM konnte für den Liganden [ $^3$ H]-CGP-12177 bestimmt werden. Dieser Wert liegt um einen Faktor von ca. 5-20 unter denen, die in anderen Expressionssystemen gemessen werden (Voss, 1998; Weiss, 1998). Für heterolog produzierte GPCRs wurde häufig eine niedrigere Affinität beschrieben (Weiss, 1998; Ivanovic, 2001). Als möglicher Grund wurde an erster Stelle die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Membran in Hefe bzw. *E. coli* im Vergleich zu Säugerzellen genannt, was hier nicht der Fall war. Für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor scheint die Vermutung plausibel zu sein, dass nicht alle produzierten Rezeptoren korrekt gefaltet sind. Die Tatsache, dass der Ligand Alprenolol einen positiven Einfluss auf die Produktion des funktionellen Rezeptors hat, unterstützt diese Annahme.

Die Signaltransduktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors erfolgt in der menschlichen Zelle über die Kopplung des  $G_s$ -Proteins. Um die Funktionalität des rekombinanten Rezeptors in Bezug auf die Signalweiterleitung zu testen, wurde der Einfluss von Agonist bzw. Antagonist auf die



intrazelluläre cAMP-Konzentration in den mit rekombinanten *Semliki Forest* Viren infizierten Säugerzellen untersucht. Die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration in den infizierten Zellen erwies sich als schwierig. Das könnte daran liegen, dass die endogene Proteinproduktion nach Eindringen der Viruspartikel stark heruntergefahren wird. Dadurch könnte die Menge an G-Proteinen bzw. Adenylatzyklen in den Zellen auf einen Wert gesunken sein, der zu gering für die erforderlichen Messungen ist. Bei einer Ausbeute von über 20 pmol Rezeptor pro mg Membranprotein, entsprechend  $2 \times 10^6$  Rezeptoren pro Zelle, ist das Verhältnis zwischen Rezeptor und G-Protein möglicherweise nicht ausreichend. Denkbar wäre auch, dass durch Virusinfektion die Zelle nicht mehr intakt und damit eine Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration nicht mehr möglich ist. Hierbei ist noch zu erwähnen, dass die obengenannten Schwierigkeiten auch bei der cAMP-Messung in mit Baculovirus infizierten Sf9-Zellen beobachtet wurden (Grünwald, 1997; Ivanovic, 2001). Bei der Verwendung einer stabil transformierten Säugerzelllinie sind solche Probleme nicht aufgetreten (Nilius, 2001; Rehwald, 2003).

Bei Messungen an infizierten CHO-K1-Zellen ( $1 \times 10^6$  Rezeptoren pro Zelle) konnte keine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Inkubation mit Agonist gezeigt werden. Ein Grund dafür könnte in der schnellen Desensibilisierungskinetik des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors liegen. In vielen Zelllinien wurde eine Desensibilisierung innerhalb von Minuten für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor beschrieben (Nilius, 2001). Die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung konnte bereits 5 min nach der Behandlung der Zelle mit dem Agonisten Isoprenalin das Maximum erreichen. Nach einer längeren Zeit konnte die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung nicht mehr gemessen werden. Die Änderung des cAMP-Spiegels in so einem kurzen Zeitraum konnte durch die in dieser Arbeit verwendete Meßmethode nicht erfasst werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Adenylatzyklase mit Forskolin (FSK) zu aktivieren und den Einfluss von Agonist und Antagonist an FSK-stimulierter cAMP-Produktion zu zeigen. FSK konnte die endogene Adenylatzyklase sowohl in nicht infizierten als auch in infizierten Zellen über einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus aktivieren, was eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge hatte. Diese FSK-stimulierte cAMP-Akkumulation konnte nur in infizierten Zellen durch Agonist weiter verstärkt bzw. durch Antagonist reduziert werden. Damit konnte demonstriert werden, dass der rekombinant produzierte Rezeptor zur effektiven Kopplung an G-Proteine fähig war.

#### 4.4 Membranpräparation und Solubilisierung

Für den Aufbruch von Säugerzellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Beim Aufschluß der Zellen ist darauf zu achten, dass die Präparation in kurzer Zeit erfolgt, um Proteinabbau durch zelleigene Proteasen zu verhindern. Weiterhin sollte eine Methode gewählt werden, die eine möglichst hohe Aufbrucheffizienz aufweist. Durch den Prozess des Einfrierens und Auftauens oder durch Osmolyse in hypotonischem Medium können die Zellen aufgeschlossen werden. Diese Methoden sind sehr schonend für die Zellen, die Effizienz ist jedoch gering. Auf einen Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde verzichtet, da es hierbei zu Denaturierung und Aggregation von Membranproteinen kommen kann.

Es stellte sich heraus, dass für die Membranpräparation im analytischen Maßstab ein Aufbruch mit Glasperlen (siehe. Kapitel 2.8.6.1) schnell und effizient durchzuführen war. Die Ausbeute von 2 mg Membranprotein pro Kulturschale ( $\varnothing$  144 mm) war ausreichend für die Bestimmung der Bindungsaktivität.

Die Membranpräparation im präparativen Maßstab in dieser Arbeit wurde in der Parr-Bombe getestet. Hier zeigte sich jedoch eine niedrige Aufbruchrate von 65%. Die nicht aufgebrochenen Zellen konnten durch eine *low-spin* Zentrifugation (500 g) gesammelt und zum Aufbruch wieder in die Parr-Bombe überführt werden. Dadurch wurde jedoch der Arbeitsvorgang verlängert und die Gefahr des proteolytischen Abbaus des Rezeptors von den intrazellulären Proteasen wurde erhöht. Ein anderer Nachteil der Parr-Bombe war die starke Schaumbildung, die zur Denaturierung des Rezeptors führen könnte. Im Gegensatz zur Parr-Bombe konnten die Zellen in großen Mengen mit der *French-Press* problemlos aufgeschlossen werden. Mit dieser raschen Methode konnten ca. 120 mg Membranprotein aus 1 Liter Kultur gewonnen werden. Hierbei lag die Ausbeute um 20% höher als bei der Parr-Bombe.

Zur Solubilisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors aus *Pichia pastoris* Membranen konnte für *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (LM) eine Solubilisierung von bis zu 100% gezeigt werden (Weiß, 1998; Reinhart, 2000). Für die Solubilisierung des Rezeptors aus der Membran von BHK-Zellen wurden verschiedenen Detergenzien untersucht. Dabei eignete sich *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid am besten, den Rezeptor zu solubilisieren, gefolgt von Digitonin. Bemerkenswert war die relativ hohe Konzentration von *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (1,5%), die hier eingesetzt

werden musste, im Vergleich zu der Detergenzkonzentration von 1% zur Solubilisierung des Rezeptors aus *Pichia pastoris* Membranen.

#### 4.5 Reinigung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass es unmöglich war den  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor mit N-terminalem Dekahistidin-Anhängsel über eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule in einem einzigen Schritt zu reinigen. Die Ausbeute bei der Reinigung mit dem „HiLoad“-Chromatographie-System betrug nur 20% und war im Vergleich zu den Reinigungen aus *Pichia pastoris* sehr niedrig (über 80%; Reinhart, 2000). Bei der Gelfiltration über eine Superose 12-Säule konnte außerdem festgestellt werden, dass ein Teil der Rezeptorpopulation in aggregierter Form vorliegt. Ähnliche Aggregation wurde auch bei den Reinigungen des  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptors aus *E. coli* (Beresten *et al.*, 1999) und *Pichia pastoris* (Reinhart, 2000) beschrieben. Dabei konnten die Aggregate durch eine Kombination von EDTA und DTT aufgelöst werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die Aggregation könnte auch die Delipidierung bei der Solubilisierung sein (Jones, 1999; Breyton *et al.*, 2004). Bei der Solubilisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors aus *Pichia pastoris*-Membranen konnten aggregierte Formen des Rezeptors festgestellt werden (Reinhart, 2000). Durch Einsatz eines GFP in Fusion zum Rezeptor konnte dabei der Zustand des Rezeptors direkt nach der Solubilisierung untersucht werden. In der Zukunft sollte auch eine ähnliche Studie für die Solubilisierung des Rezeptors aus den Membranen der Säugerzellen durchgeführt werden.

Bei der Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mittels IMAC wurde festgestellt, dass ein großer Teil des bindungsaktiven Rezeptors im Durchlauf verloren ging. Mit dem monoklonalen Antikörper 15H6 konnte ein verkürzter Rezeptor mit einem apparenten Molekulargewicht von 45 kDa auf dem Western-Blot gezeigt werden. Das Epitop vom monoklonalen Antikörper 15H6 liegt im C-terminalen Bereich des Rezeptors. Die verkürzte Form des Rezeptors entsteht möglicherweise durch die proteolytische Spaltung am C-Terminus des Rezeptors und unter Verlust des Dekahistidin-Anhängsels. Möglicherweise konnten die hier eingesetzten Inhibitoren den Proteinabbau durch zellinterne Proteasen nicht vollständig verhindern. Ein ähnliches Problem wurde auch bei der Reinigung von in *Pichia pastoris* produzierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren beobachtet (Weiß, 1998).

## 4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der humane  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor im mg-Maßstab mit dem *Semliki Forest* Virus-Expressionssystem produziert werden kann. Hierbei ist zu erwähnen, dass vor allem die Produktion in Suspensionskultur noch verbessert werden muss. Die weitere Optimierung könnte durch Regulierung von Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- sowie Nährstoff-Konzentration im Medium erfolgt werden (Schläger & Lundström, 1998; Cruz *et al.*, 2000; Blasey *et al.*, 2000). Um dies zu verwirklichen, sollte die Suspensionskultur in einem Inkubator oder Bioreaktor mit entsprechenden technischen Ausstattungen herangezogen werden.

Die Charakterisierung des Rezeptors zeigte, dass der heterolog produzierte Rezeptor in BHK-21-Zellen möglicherweise N-Glykane vom mannosereichen Typ trug. Es wurde jedoch berichtet, dass die BHK-Zellen die rekombinanten Proteine mit N-Glykanen vom komplexen Typ modifizieren können (Grabenhorst *et al.*, 1999). Hierbei wäre eine weitere Untersuchung interessant, ob und warum der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ausschließlich diese ungereifte Form von Glykan trug.

Die Ursache für die falsche Lokalisation des Rezeptors in den Zellen sollte geklärt werden. Die Existenz anderer posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Palmitoylierung und Phosphorylierung, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Hierbei wäre interessant zu wissen, ob die geringe Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche mit einer Liganden-unabhängigen Phosphorylierung verbunden ist.

Für die Reinigung des Rezeptors in zukünftigen Experimenten wäre eine Reinigungsstrategie mit Kombination aus IMAC und einer anschließenden Affinitätschromatographie, wie z.B. Alprenolol-Sepharose-Matrix oder monomere Avidin-Säule vorstellbar. Dazu sollte die Überproduktion mit einem anderen Rezeptorkonstrukt, wie z.B. His $\beta_2$ ARBio optimiert werden. Die Kombination von EDTA und DTT sollte zur Auflösung von Aggregation nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule eingesetzt werden. Außerdem sollten weitere Proteaseinhibitoren getestet werden, um die proteolytische Spaltung des Rezeptors vollständig zu blockieren.

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sollte es in Zukunft möglich sein, den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor in Suspensionskultur im großen Maßstab zu produzieren. Mit genügendem Rezeptor könnte eine effektive Reinigung für 3D-Kristallisation erreicht werden.

- Adler E., Hoon M.A., Mueller K.L., Chandrashekar J., Ryba N.J.P., Zuker C.S.** (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693-702
- Appel M.** (2003) Etablierung und Optimierung des *Semliki Forest* Virus Expressionssystems am Beispiel der Produktion von GFP und des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors in Säugerzellen. *Dissertation*: Technische Universität, Braunschweig
- Baldwin, J.M.** (1993) The probable arrangement of the helices in G-protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12:1693-1703
- Ballesteros J.A., Jensen A.D., Liapakis G., Rasmussen S.G., Shi L., Gether U. and Javitch J.A.** (2001) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 276:29171-29177
- Beresten S.F., Stan R., van Brabant A.J., Ye T., Naureckiene S., Ellis N.A.** (1999) Purification of overexpressed hexahistidine-tagged BLM N431 as oligomeric complexes. *Protein Expression and Purification* 17(2):239-48
- Berglund P., Sjöberg M., Garoff H., Atkins G.J., Sheahan B.J., Liljestrom P.** (1993) Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N Y)* 11(8):916-20
- Bernier V., Bichet D.G., Bovier M.** (2004) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 4(5):528-533
- Björklöf K., Lundström K., Abuin L., Greasley P.J., Cotecchia S.** (2002) Co- and posttranslational modification of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor: Effects on receptor expression and function. *Biochemistry* 41:4281-4291
- Blasey H.D., Lundström K., Tate S., Bernard R.L.** (1997) Recombinant protein production using the Semliki Forest Virus expression system. *Cytotechnology* 24: 65-72
- Blasey H.D., Brethon B., Hovius R., Vogel H., Tairi A.P., Lundstrom K., R. L. Bernard A.R.** (2000) Large scale transient 5-HT<sub>3</sub> receptor production with the Semliki Forest virus expression system. *Cytotechnology* 32:199-208
- Bockaert J., Pin J.P.** (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18(7):1723-9
- Bockaert J., Marin P., Dumuis A., Fagni L.** (2003) The 'magic tail' of G-protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* 546:65-72
- Bouvier M.** (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(4):274-86
- Bouvier M., Hausdorff W.P., De Blasi A., O'Dowd B.F., Kobilka B.K., Caron M.G., Lefkowitz R.J.** (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333(6171):370-3

- Breyton C., Chabaud E., Chaudier Y., Pucci B., Popo J.** (2004) Hemifluorinated surfactants: a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions? *FEBS Lett.* 564(3):312-318
- Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R. Jr., Trendelenburg U.** (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological Reviews* 46: 121-136
- Chandrashekar J., Mueller K.L., Hoon M.A., Adler E., Feng L., Guo W., Zuker C.S., Ryba N.J.** (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100:703-11
- Chen C.Y., Dion S.B., Kim C.M., Benovic J.L.** (1993) Beta-adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J. Biol. Chem.* 268(11):7825-31
- Ciccarone V., Anderson D., Jessee J.** (1994) Heterologous protein expression in mammalian cells with the SFV gene expression system. *Focus* 16(4): 94-98
- Collins S.** (1993) Recent perspectives on the molecular structure and regulation of the beta 2-adrenoceptor. *Life Sci.* 52(26):2083-91
- Collins S., Altschmied J., Herbsman O., Caron M.G., Mellon P.L., Lefkowitz R.J.** (1990) A cAMP response element in the beta 2-adrenergic receptor gene confers transcriptional autoregulation by cAMP. *J Biol Chem.* 265(31):19330-5
- Collins S., Caron M.G., Lefkowitz R.J.** (1991a) Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* 53:497-508
- Collins S., Lohse M.J., O'Dowd B., Caron M.G., Lefkowitz R.J.** (1991b) Structure and regulation of G protein-coupled receptors: the beta 2-adrenergic receptor as a model. *Vitam. Horm.* 46:1-39.
- Cruz H.J., Moreira J.L., Carrondo M.J.T.** (2000) Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. *J. Biotechn.* 80:109-118
- Davenport A.P.** (2003) Peptide and trace amine orphan receptors: prospects for new therapeutic targets. *Current Opinion in Pharmacology* 3(2):127-134
- Devi L.A.** (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(10):532-7
- DiCiommo D.P., Bremner R.** (1998) Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *J. Biol. Chem.* 273(29):18060-6
- Dohlman H.G., Caron M.G., Strader C.D., Amlaiky N., Lefkowitz R.J.** (1988) Identification and sequence of a binding site peptide of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 27(6):1813-7

- Emorine L.J., Marullo S., Delavier-Klutchko C., Kaveri S.V., Durieu-Trautmann O., Strosberg A.D.** (1987) Structure of the gene for human beta 2-adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84(20):6995-9
- Ferguson S.S.** (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53(1):1-24
- Figler R.A., Omote H., Nakamoto R.K., Al-Shawi M.K.** (2000) Use of Chemical Chaperones in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* to Enhance Heterologous Membrane Protein Expression: High-Yield Expression and Purification of Human P-Glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 376(1):34-46
- Filipek S., Teller D.C., Palczewski K., Stenkamp R.** (2003) The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:375-97
- Flower D.R.** (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim. Biophys. Acta.* 1422:207-234
- Forth W., Henschler D., Rummel W.** (2004) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford
- Fraser C.M., Venter J.C.** (1990) Beta-adrenergic receptors. Relationship of primary structure, receptor function, and regulation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141(2 Pt 2):S22-30.
- Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schioth H.B.** (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63:1256-1272
- Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prezeau L., Pin J.P.** (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* 20(9):2152-9
- Garoff H., Kondor-Koch C., Riedel H.** (1982) Structure and assembly of alphaviruses. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 99:1-50
- Garry R.F.** (1994) Sindbis virus-induced inhibition of protein synthesis is partially reversed by medium containing an elevated potassium concentration. *J. Gen. Virol.* 75 ( Pt 2):411-5
- Gershengorn M.C., Osman R.** (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* 142(1):2-10
- Gether U., Kobilka B.K.** (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* 273(29):17979-82
- Grabenhorst E., Schlenke P., Pohl S., Nimtz M., Conradt H.S.** (1999) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate J.* 16:81-97
- Graham R.M., Perez D.M., Hwa J., Piascik M.T.** (1996) alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ. Res.* 78(5):737-49.

**Grisshammer R., Tate C.G.** (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.* 28(3):315-422

**Grünewald S.** (1997) Produktion des humanen Dopamin D2s Rezeptors in Insektenzellen: Biochemische und pharmakologische Charakterisierung sowie Entwicklung eines *in vitro* Rekonstitutionssystems zur Untersuchung des G-Protein-Kopplung. *Dissertation*: Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

**Gudermann T., Nurnberg B., Schultz G.** (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.* 73(2):51-63.

**Gudermann T., Grosse R., Schultz G.** (2000) Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361(4):345-62

**Hague C., Chen Z., Uberti M., Minneman K.P.** (2003) Alpha(1)-adrenergic receptor subtypes: non-identical triplets with different dancing partners? *Life Sci.* 74(4):411-8.

**Hall R.A., Lefkowitz R.J.** (2002) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ. Res.* 91(8):672-80

**Harmar A.J.** (2001) Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* 2:REVIEWS3013

**Hartl F.U., Hlodan R., Langer T.** (1994) Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* 19(1):20-5

**Hausdorff W.P., Bouvier M., O'Dowd B.F., Irons G.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J.** (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 264(21):12657-65

**Hayflick J.S.** (2000) A family of heptahelical receptors with adhesion like domains: a marriage between two superfamilies. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 20:119-131

**Helenius A., Kartenbeck J., Simons K., Fries E.** (1980) On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells. *J. Cell Biol.* 84:404-420

**Herweijer H. and Wolff J.A.** (1997) Self-amplifying vectors for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 27(1):5-16

**Hoffmann M., Verzijl D., Lundstrom K., Simmen U., Alewijnse A.E., Timmerman H., Leurs R.** (2001) Recombinant Semliki Forest virus for over-expression and pharmacological characterisation of the histamin H<sub>2</sub> receptor in mammalian cells. *European J. Pharmacol.* 427:105-114

**Howard, A.D., McAllister, G., Feighner, S.D., Liu, Q., Nargund, R.P., Van der Ploeg, L.H.T., Patchett, A.A.** (2001) Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends in Pharmacol. Sci.* 22(3):132-40

**Hsu S.Y., Nakabayashi K., Nishi S., Kumagai J., Kudo M., Sherwood O.D., Hsueh A.J.** (2002) Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 295(5555):671-4



- Isogaya M., Sugimoto Y., Tanimura R., Tanaka R., Kikkawa H., Nagao T., Kurose H.** (1999) Binding pockets of the beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors for subtype-selective agonists. *Mol. Pharmacol.* 56(5):875-85
- Ivanovic A.** (2001) Klonierung rekombinanter Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren und deren Charakterisierung, Solubilisierung und Reinigung nach heterologer Produktion. *Dissertation: Fakultät der chemischen und pharmazeutischen Wissenschaften.* Frankfurt am Main, Johann Wolfgang-Goethe-Universität
- Ji T.H., Grossmann M., Ji I.** (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273(28):17299-302
- Jones M.N.** (1999) Surfactants in membrane solubilisation. *J. Pharmaceutics* 177(2):137-159
- Jordan B.A., Devi L.A.** (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399(6737):697-700
- Karschin A.** (1993) Heterologous expression of the membrane proteins that control cellular excitability. *EXS.* 63:31-47
- Kiefer H., Maier K., Vogel R.** (1999) Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli. *Biochem. Soc. Trans.* 27(6):908-12
- King K., Dohlman H.G., Thorner J., Caron M.G., Lefkowitz R.J.** (1990) Control of yeast mating signal transduction by a mammalian  $\beta_2$ -adrenergic receptor and G<sub>s</sub>  $\alpha$  subunit. *Science* 250:121-123
- Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K.** (2001) Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol. Metabol.* 12(3):118-122
- Kolakowski, J.L.F.** (1994) GCRDb: A G-Protein-Coupled Receptor Database. *Receptors Channels* 2:1-7
- Kozak, M.** (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44(2):283-292
- Kozak, M.** (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234:187-208
- Krebs A., Edwards P.C., Villa C., Li J., Schertler G.F.** (2003) The three-dimensional structure of bovine rhodopsin determined by electron cryomicroscopy. *J. Biol. Chem.* 278(50):50217-25
- Krieg P.A., Melton D.A.** (1987) In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 155:397-415.
- Lachance M., Ethier N., Wolbring G. Schnetkamp P.P.M., Hebert, T.E.** (1999) Stable Association of G Proteins with  $\beta_2$ AR Is Independent of the State of Receptor Activation. *Cellular Signalling* 11(7):523-533

- Laporte S.A., Oakley R.H., Holt J.A., Barak L.S., Caron M.G.** (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 275(30):23120-6
- Laugwitz K.L., Allgeier A., Offermanns S., Spicher K., Van Sande J., Dumont J.E., Schultz G.** (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(1):116-20
- Leandro P., Lechner M.C., de Almeida I.T., Konecki D.** (2001) Glycerol Increases the Yield and Activity of Human Phenylalanine Hydroxylase Mutant Enzymes Produced in a Prokaryotic Expression System. *Mol. Gen. Metabol.* 73(2):173-178
- Lefkowitz R.J.** (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273(30):18677-80
- Leineweber K., Brodde O.E.** (2004)  $\beta_2$ -adrenoceptor polymorphisms: Relation between in vitro and in vivo phenotypes. *Life Sci.* 74:2803-14
- Liapakis G., Ballesteros J.A., Papachristou S., Chan W.C., Chen X., Javitch J.A.** (2000) The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 275(48):37779-88
- Liggett S.B.** (2000)  $\beta_2$ -adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:S197-201
- Liljestrom P., Garoff H.** (1991) A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* 9(12):1356-61
- Lundstrom, K.** (1999) Alphaviruses as tools in neurobiology and gene therapy. *J.Recept. Signal Transduct. Res.* 19: 673-686
- Lundstrom K.** (2000) Alphavirus vectors: Applications for DNA vaccine production and gene expression. *Intervirology* 43:247-257
- Lundstrom K.** (2003) Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1610:90-96
- Lundstrom K., Vargas A., Allet B.** (1995) Functional Activity of a biotinylated human neurokinin 1 receptor fusion expressed in the semliki forest virus system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208(1):260-266
- Lundstrom K., Michel A., Blasey H., Bernard A.R., Hovius R., Vogel H., Surprenant A.** (1997) Expression of ligand-gated ion channels with the Semliki Forest virus expression system. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 17(1-3):115-26
- Lundstrom K., Turpin M.P., Large C., Robertson G., Thomas P., Lewell X.Q.** (1998) Mapping of dopamine D3 receptor binding site by pharmacological characterization of mutants expressed in CHO cells with the Semliki Forest virus system. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 18(2-3):133-50

- Lundstrom K., Schweitzer C., Richards J.G., Ehrenguber M.U., Jenck F., Mülhardt C.** (1999) Semliki Forest virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications. *Gene Ther. Mol. Biol.* 4:23-31
- Lundstrom K., Schweitzer C., Rotmann D., Hermann D., Schneider E.M., Ehrenguber M.U.** (2001) Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for *in vitro* and *in vivo* gene delivery. *FEBS Lett.* 504:99-103
- MacMillan L.B., Lakhani P., Lovinger D., Limbird L.E.** (1998) Alpha 2-adrenergic receptor subtypes: subtle mutation of the alpha 2A-adrenergic receptor *in vivo* by gene targeting strategies reveals the role of this subtype in multiple physiological settings. *Recent Prog. Horm. Res.* 53:25-42
- Mak J.C., Nishikawa M., Barnes P.J.** (1995) Glucocorticosteroids increase beta 2-adrenergic receptor transcription in human lung. *Am. J. Physiol.* 268(1 Pt 1):L41-6
- Marchese A., George S.R., Kolakowski L.F. Jr., Lynch K.R., O'Dowd B.F.** (1999) Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(9):370-5
- Massotte D.** (2003) G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus–insect cell system: a tool for structural and functional studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes* 1610(1):77-89
- Matsunami, H., Montmayeur, J. P. & Buck, L. B.** (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404:601-4
- Mathiot C.C., Grimaud G., Garry P., Bouquety J.C., Mada A. Daguisy A.M., Georges A.J.** (1990) An outbreak of human Semliki Forest virus infections in Central African Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42:386-393
- Meng E.C. and Bourne H.R.** (2001) Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol. Sci.* 22 :587-593
- Minning S.** (1999). "Die Lipase aus *Rhizopus oryzae*: Klonierung, Expression, Reinigung und Mutagenese eines industriell relevanten Enzyms für die Biokatalyse und die Strukturbestimmung." *Dissertation*: Chemische Fakultät, Universität Stuttgart, Stuttgart
- Mitchell T.J., Tute M.S., Webb G.A.** (1989) A molecular modelling study of the interaction of noradrenaline with the beta 2-adrenergic receptor. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 3(3):211-23
- Moffett S., Mouillac B., Bonin H., Bouvier M.** (1993) Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.* 12(1):349-56
- Moffett S., Adam L., Bonin H., Loisel T.P., Bouvier M., Mouillac B.** (1996) Palmitoylated cysteine 341 modulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271(35):21490-7
- Moffett S., Rousseau G., Lagace M., Bouvier M.** (2001) The palmitoylation state of the beta(2)-adrenergic receptor regulates the synergistic action of cyclic AMP-dependent protein

kinase and beta-adrenergic receptor kinase involved in its phosphorylation and desensitization. *J Neurochem.* 76(1):269-79

**Monastyrskaia K., Goepfert F., Hochstrasser R., Acuña G., Leighton J., Pink J.R., Lundstrom K.** (1999) Expression and intracellular localisation of odorant receptors in mammalian cell lines using Semliki Forest virus vectors. *J Recept Signal Transduct Res* 19(1-4):687-701

**Mouillac B., Caron M., Bonin H., Dennis M., Bouvier M.** (1992) Agonist-modulated palmitoylation of beta 2-adrenergic receptor in Sf9 cells. *J. Biol. Chem.* 267(30):21733-7

**Nagatsu T., Stjarne L.** (1998) Catecholamine synthesis and release. Overview. *Adv. Pharmacol.* 42:1-14

**Nakajima Y., Kimura T., Suzuki C., Ohmiya Y.** (2004) Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of *Phrixothrix* railroad worms in mammalian cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(4):948-51

**Nilius S.M.** (2001) Regulation des Prostacyclin-Rezeptors in humanen glatten Gefäßmuskelnzellen und Fibroblasten. *Dissertation:* Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

**Noda K., Saad Y., Graham R.M., Karnik S.S.** (1994) The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J. Biol. Chem.* 269(9):6743-52

**Nurnberg B., Gudermann T., Schultz G.** (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J. Mol. Med.* 73(3):123-32

**O'Dowd B.F., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M.** (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 264(13):7564-9

**Offermanns S.** (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Pro. Biophy. Mol. Biol.* 83(2):101-130

**Olson J.M., Kennedy S.J., Cabral G.A.** (2003) Expression of the murine CB2 cannabinoid receptor using a recombinant Semliki Forest virus. *Biochem. Pharmacol.* 65:1931-1942

**Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M.** (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 4;289(5480):739-45

**Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J.** (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(9):639-50.

**Pike L.J.** (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44(4):655-67

- Ponimaskin E.G., Schmidt M.F., Heine M., Bickmeyer U., Richter D.W.** (2001) 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *Biochem. J.* 353(Pt 3): 627-34.
- Ramirez M.I., Boscardin S.B., Han S.W., Paranhos-Baccala G., Yoshida N., Kelly J.M., Mortara R.A., Da Silveira J.F.** (1999) Heterologous expression of a Trypanosoma cruzi surface glycoprotein (gp82) in mammalian cells indicates the existence of different signal sequence requirements and processing. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46(6):557-65.
- Rands E., Candelore M.R., Cheung A.H., Hill W.S., Strader C.D., Dixon R.A.** (1990) Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J. Biol. Chem.* 265(18):10759-64
- Rehwald, M.** (2003) Identifizierung der für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung und Internalisierung relevanten Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des humanen Prostaglandin E2 Rezeptors, Subtyp EP4. *Dissertation:* Georg-August-Universität, Göttingen
- Reinhart, C.** (2000) Charakterisierung, Solubilisierung und Reinigung des humanen  $\beta_2$  – adrenergen Rezeptors nach heterologer Produktion in der methyloptrophischen Hefe *Pichia pastoris*. *Dissertation:* Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- Resh M.D.** (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1451(1):1-16
- Rios C.D., Jordan B.A., Gomes I., Devi L.A.** (2001) G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol. Ther.* 92(2-3):71-87
- Robas N., O'Reilly M., Katugampola S., Fidock M.** (2003) Maximizing serendipity: strategies for identifying ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:121-126
- Robert I., Quirin-Stricker C.** (1998) Production and functional expression of an epitope-tagged human choline acetyltransferase. *J. Mol. Neurosci.* 11(3):243-51
- Ross E.M. & Wilkie T.M.** (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69:795-827
- Sano K., Maeda K., Oki M., Maeda Y.** (2002) Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence. *FEBS Lett.* 532(1-2):143-6
- Sarramengna V., Talmont F., Demange P., Milon A.** (2003) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1529-1546
- Sautel M. and Milligan G.** (2000) Molecular manipulation of G-protein-coupled receptors: a new avenue into drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 7:889-896
- Scheer A., Bjorklof K., Cotecchia S., Lundstrom K.** (1999) Expression of the alpha 1b-adrenergic receptor and G protein subunits in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 19(1-4):369-78

- Schläger E.J., Lundstrom K.** (1998) Effect of temperature on recombinant protein expression in Semliki Forest virus infected mammalian cell lines growing in serum-free suspension cultures. *Cytotechnology* 28: 205-211
- Schiller H., Haase W., Molsberger E., Janssen P., Michel H., Reiländer H.** (2000) The human ET(B) endothelin receptor heterologously produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* shows high-affinity binding and induction of stacked membranes. *Receptors channels* 7:453-69
- Schoneberg T., Schulz A., Gudermann T.** (2002) The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 144:143-227
- Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H.** (2004) Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Front. Horm. Res.* 31:1-25
- Schwindinger W.F., Robishaw J.D.** (2001) Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 20(13):1653-60
- Sekikawa K., Lai C.J.** (1983) Defects in functional expression of an influenza virus hemagglutinin lacking the signal peptide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 80(12):3563-7
- Sen S., Jaakola V.P., Heimo H., Engström M., Larjomaa P., Scheinin M., Lundstrom K., Goldman A.** (2003) Functional expression and direct visualization of the human  $\alpha_{2b}$ -adrenergic receptor and  $\alpha_{2b}$ -AR-green fluorescent fusion protein in mammalian cell using Semliki Forest virus vectors. (2003) *Protein Expression Purification* 32:265-275
- Shapiro D.A., Kristiansen K., Weiner D.M., Kroeze W.K. and Roth B.L.** (2002) Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2A serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 277:11441-11449
- Sheppard J.R., Wehner J.M., McSwigan J.D., Shows T.B.** (1983) Chromosomal assignment of the gene for the human beta 2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80(1):233-6
- Simons K., Garoff H., Helenius A.** (1977) The glycoproteins of the Semliki Forest virus membrane. In: Capaldi R(ed) *Membrane proteins and their interaction with Lipids*, vol.1. Dekker, New York, pp 207-234
- Simons K., Ikonen E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387(6633):569-72
- Sizmann D., Kuusinen H., Keränen S., Lomasney J., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Keinänen K.** (1996) Production of adrenergic receptors in yeast. *Receptors Channels* 4(3):197-203
- Slusarski D.C., Corces V.G., Moon R.T.** (1997) Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature (London)* 390:410-413

- Smithburn K.C. & Haddow A.J.** (1944) Semliki Forest viru. I. Isolation and pathogenic properties. *J. Immun.* 49:141-157
- Strader C.D., Fong T.M., Graziano M.P., Tota M.R.** (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 9(9):745-54
- Strauss J.H. & Strauss E.G** (1994) The alphaviruses: Gen expression, Replikation, and Evolution. *Microb. Rev.* 58(3):491-562
- Strosberg AD.** (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:421-50
- Strosberg A.D., Marullo S.** (1992) Functional expression of receptors in microorganisms *Trends Pharmacol. Sci.* 13(3):95-8
- Suryanarayana S., Kobilka B.K.** (1993) Amino acid substitutions at position 312 in the seventh hydrophobic segment of the beta 2-adrenergic receptor modify ligand-binding specificity. *Mol. Pharmacol.* 44(1):111-4
- Takeda S., Kadowaki S., Haga T., Takaesu H., Mitaku S.** (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* 520:97-101
- Tate C.G.** (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* 504(3):94-98
- Tate C.G., Grisshammer R.** (1996) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol.* 14(11):426-30
- Vassilatis D.K., Hohmann J.G., Zeng H., Li F., Ranchalis J.E., Mortrud M.T., Brown A., Rodriguez S.S., Weller J.R., Wright A.C., Bergmann J.E., Gaitanaris G.A.** (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *PNAS* 100(8):4903-8
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A.** (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351
- Voss, H.** (1998) Charakterisierung gentechnisch veränderter  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren. *Dissertation: Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt*
- Weiss, H.M.** (1998) Produktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* und deren Charakterisierung und Reinigung. *Dissertation: Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt*
- Weiss B.G. and Schlesinger S.** (1991) Recombination between Sindbis virus RNAs. *J. Virol.* 65:4017-25
- Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., Reiländer, H.** (1995) Expression of functional mouse 5HT<sub>5A</sub> serotonin receptor in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.* 377:451-456

- Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., Reiländer, H.** (1998) Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT<sub>5A</sub> 5-hydrotryptamine receptor and the human  $\beta_2$  adrenergic receptor in yeast. *Receptors Channels* 4:197
- Wess J.** (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11(5):346-54
- Wieland K., Zuurmond H.M., Krasel C., Ijzerman A.P., Lohse M.J.** (1996) Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(17):9276-81
- Willems W.R., Kaluza G., Boschek C.B., Bauer H., Hager H. Schütz H.J., Feistner H.** (1979) Semliki Forests virus: cause of a fatal case of human encephalitis. *Science* 203: 1127-9
- Zamah A.M., Delahunty M., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J.** (2002) Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 277(34):31249-56



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michel für die interessante und anspruchsvolle Themenstellung und die Betreuung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Vertretung im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Dr. Christoph Reinhart danke ich für die freundliche Unterstützung und die Korrektur dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich allen Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michel sowie der Belegschaft von Werkstatt, Haustechnik, Verwaltung und Bibliothek des MPI für Biophysik danken, die mir bei der Arbeit geholfen haben.

Ein großes Dankeschön auch meine Familie, die es während der ganzen Zeit verstanden hat mich immer wieder neu zu motivieren.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Darui Huo

Geburtsdatum: 06.07.1971

Geburtsort: Nanjing, V.R.China

## **Schulbildung**

Grundschule und Gymnasium in Nanjing, 1978-1989

## **Studium**

Biochemie an der Nanjing Universität, 1989-1991

Das deutsche Studeinkolleg an der Tongji Universität in Shanghai, 1991-1992

Biochemie an der Universität Tübingen, 1992-2000

Diplomarbeit: Desoxynukleosid-Triphosphat-Pools von HeLa-Zellen und  
SV40-infizierten CV1-Zellen im Zusammenhang mit der  
schnellen, O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation der DNA-Replikation

## **Promotion**

Seit Mai, 2000, am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main in der Abteilung  
von Prof. Dr. Hartmut Michel

## **Akademische Lehrer**

Biochemie: Prof. Dr. B. Hamprecht, Prof. Dr. H. Michel

Biophysikalische Chemie: Prof. Dr. W. Voelter

Organische Chemie: Prof. Dr. M. E. Maier

Physikalische Chemie: Prof. Dr. H. Oberhammer

Molekulare Zellbiologie: Prof. Dr. H. Probst

Anorganische Biochemie: Prof. Dr. U. Weser

**Table A.1: SFV-based expression of membrane protein (Kenneth Lundstrom, 2003)**

Membrane protein	Host cell	Function	Expression level	Ref.
Transferrin receptor	BHK	single transmembrane	5-10% of membrane protein	[Liljeström/Garoff, 1991]
Serotonin 5-HT <sub>3</sub> receptor	BHK, CHO, neurons	ligand-gated ion channel	60 pmol/mg; 2 mg/l	[Werner <i>et al.</i> , 1994 ; Lundstrom <i>et al.</i> , 1997]
Purinoreceptor P2X <sub>1</sub> , 2, 4	BHK, CHO	ligand-gated ion channel	70-150 pmol/mg	[Michel <i>et al.</i> , 1996]
Adenosine A <sub>1</sub> , A <sub>2a</sub> , A <sub>2b</sub> , A <sub>3</sub>	BHK, CHO	GPCR	20-50 pmol/mg; 2 mg/l	[Lundstrom, unpublished results; Patel <i>et al.</i> , 1997]
Adrenergic $\alpha$ <sub>1b</sub> , $\alpha$ <sub>2b</sub> , $\beta$ <sub>2</sub>	BHK, COS	GPCR	1 pmol/mg	[Björklöf <i>et al.</i> , 2002]
Cannabinoid R <sub>1</sub>	BHK, CHO	GPCR	40-200 pmol/mg; 5 mg/l	[Lundstrom, unpubl. results]
Chemokine CCK-1, CCK-2	BHK	GPCR	20 pmol/mg	[Lundstrom, unpubl. results]
Dopamine D <sub>2</sub> , 3, 4	BHK, CHO, HOS	GPCR	300,000 receptors/cell	[Lundstrom <i>et al.</i> , 1998]
Endothelin A, B	BHK, COS	GPCR	20-50 pmol/mg	[Cramer <i>et al.</i> , 2001]
Galanin R <sub>1</sub> , 2, 3	BHK, CHO	GPCR	20 pmol/mg	[Lundstrom, unpubl. results]
Histamine receptor H <sub>1</sub> , 2	CHO, COS	GPCR	20-50 pmol/mg	[Hoffmann <i>et al.</i> , 2001]
Interleukin IL <sub>8A</sub> , B	BHK	GPCR	50-100 pmol/mg	[Lundstrom, unpubl. results]
Metabotropic mGluR <sub>1</sub>	BHK, CHO, neurons	GPCR	120,000 receptors/cell	[Lundstrom, unpubl. results;
2, 3, 4, 8			120 pmol/mg; 3-6 mg/l	Schweitzer <i>et al.</i> , 2000;
			9-20 pmol/mg	Malherbe <i>et al.</i> , 1999]
Neurokinin receptor 1, 2	BHK, CHO, HOS	GPCR	40-100 pmol/mg; 10 mg/l	[Lundstrom <i>et al.</i> , 1994; 1995]
Olfactory receptor	BHK, HEK293, OLF442	GPCR	10-20 % of membrane protein	[Monastyrskaja <i>et al.</i> , 1999]
Opioid receptor $\delta$ , $\kappa$ , $\mu$	BHK, CHO, HEK293, C6	GPCR	20-50 pmol/mg; 1-3 mg/l	[Lundstrom <i>et al.</i> , 1998]
Prostaglandin E <sub>2</sub> ep <sub>4</sub>	BHK, CHO	GPCR	3 pmol/mg	[Marshall <i>et al.</i> , 1997]
Serotonin 5-HT <sub>1</sub> , 6, 7	BHK, CHO, HEK293	GPCR	20-50 pmol/mg; 1-3 mg/l	[Simmen <i>et al.</i> , 2001]
Dopamine transporter	BHK	transporter	[ <sup>3</sup> H] dopamine uptake only	[Lenhard <i>et al.</i> , 1998]
Cyclooxygenase 1, 2	BHK, CHO	membrane-associated	4000 pg PGE <sub>2</sub> /μg micros. prot.	[Blasey <i>et al.</i> , 1997]
Catechol- <i>o</i> -methyltransferase	BHK, Neurons	membrane-bound	10-20 % of total protein	[Ulanen <i>et al.</i> , 1997]
Presenilin 1, 2	BHK, neurons	transmembrane protein	localization studies only	[Cook <i>et al.</i> , 1996]
APP	BHK, CHO, neurons	amyloid precursor protein	20 % of total protein	[Simons <i>et al.</i> , 1995]
GABA <sub>A</sub> receptor	BHK, neurons	heteromeric channel	0.5-2 pmol/mg	[Gorrie <i>et al.</i> , 1997]
Potassium channel K <sub>V</sub> 1.1, 1.2	CHO	octomeric channel	functional studies only	[Shamotienko <i>et al.</i> , 1999]
Yeast syntaxin Sso2p	BHK	membrane insertion	localization studies only	[Jäntti <i>et al.</i> , 1994]
G proteins: G $\alpha$ q, G $\beta$ 2, G $\gamma$ 2	BHK, COS	membrane-associated	functional coupling to GPCRs	[Scheer <i>et al.</i> , 1999]